UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUN 28 49

# EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Bern Zürich Genève
Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

Vol. V - Fasc. 5 15. V. 1949 Fr. 2.50

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

F. Kögl: Chemische und biochemische Untersuchungen über Tumorproteine . . . . . 173
R. Glocker: Aussichten einer Tiefentherapie mit schnellen Elektronenstrahlen . . . . . 181
G. Mansfeld: New Pathways of the Physiology of Infection and Immunity . . . . . 188

*Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

C. A. Grob und Hj. U. Schmid: Die Dehydrierung primärer und sekundärer Alkohole mit N-Chlorsuccinimid . . 199
F. Bengen und W. Schlenk jr.: Über neuartige Additionsverbindungen des Harnstoffs . . . . . 200
C. Schöpf: Konstitution und Bildungsmechanismus des Pavins . . . . . 201
W. J. Nickerson: Dependence, in Yeasts, of Phosphate Uptake and Polymerization upon the Occurrence of Glucose Polymerization . . . . . 202
C. Djerassi, C. R. Scholz, and J. H. Leathem: $\Delta^1$-Desoxycorticosterone Acetate . . . . . 204
J. Brachet and J. R. Shaver: The Injection of Embryonic Microsomes into early Amphibian Embryos . . . . . 204
O. Harnisch: Beobachtungen an viruskranken Larven von *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabr. . . . . 205
M. Keil: The Origin of Moss Gametophytes in Cultures without Access of Light . . . . . 206
Z. M. Bacq: Cardiac Glucosides and Lundsgaard Contracture . . . . . 207
L. A. Pálos: Protecting Effect of Heparin on the Oxidation of Thrombin . . . . . 207
Imre Magyar: Effect of Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, and Nicotinic Acid on the Intestinal Absorption of Dextrose . . . . . 208
Sven Linde: Inhibitory Effect of Simultaneous Administration of Antasten and Tween 20 on Gastric Secretion Induced by Histamine or Vagal Stimulation . . . . . 209
M. Polonovski et G. Schapira: Sur un comportement singulier de la L(—)-phénylalanine en présence d'extraits testiculaires . . . . . 209
T. Edlund and B. H. Persson: The Influence of Polar Solvents on the Metachromatic Reaction *in vitro* . . . . . 210
I. Andik, L. Balogh, Sz. Donhoffer, and Gy. Mestyán: The Thyroxine Sensitivity of Normal and Thyroidectomized Rats . . . . . 211
C. Heymans et G. van den Heuvel: Substances synaptolytiques, curarisantes et nicotinolytiques . . . . . 213
L. Barta: Reduktionsfähigkeit des Urins bei Nierenkrankheiten . . . . . 214
E. Sartori und M. Bolletti: Zur Frage der Beziehungen zwischen Anfällen von Spasmophilie und ultravioletter Sonnenstrahlung (Disputanda) . . . . . 214
(Miss) D. Mukherji, R. Robinson, and E. Schlittler: Chemistry of Ajmaline, Rauwolfine of Van Itallie and Steenhauer (Disputanda) . . . . . 215

*Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews*

Farmacología y sus aplicaciones terapéuticas. Por Carlos Gutierrez-Noriega (Editora Médica Peruana, Lima/Perú, 1946) (Ref. K. Soehring) . . . . . 217
Die Sauna. Von V. R. Ott (Benno Schwabe & Co., Basel 1948) (Ref. H. Ludwig) . . . . . 218

*Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

Studiorum progressus: Friedrich Schaller: Die Halterenfrage. – Suisse–Italie: Congrès international de physique 218–220

# EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

**E X P E R.**


L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 2.50. Abonnement pour un an fr. 24.— pour la Suisse; pour l'étranger fr. 28.—. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la parution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant

Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à par. de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 200.—, $^1/_2$ page fr. 120.—, $^1/_4$ page fr. 70.—. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

*Editions Birkhæuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstraße 15*
*Tél. 49800; adresse télégraphique: Edita Bâle*

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Luxemburg, Dänemark, Schweden, Norwegen, Finnland, Tschechoslowakei, Portugal und Marokko nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.

Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 24.—, im Ausland sFr. 28.—; die Einzelnummer kostet Fr. 2.50.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschließlich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluß 35 Tage vor Erscheinungstermin, d. h. am 10. des Monats für den folgenden Monat.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 200.—, $^1/_2$ Seite Fr. 120.—, $^1/_4$ Seite Fr. 70.—; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

*Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15*
*Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel*

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 2.50. L'abbonamento annuo è di fr. 24.— per la Svizzera; all'estero fr. 28.—. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 200.—, $^1/_2$ pag. fr. 120.—, $^1/_4$ pag. fr. 70.—; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

*Casa editrice Birkhæuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15*
*Tel. 49800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea*

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 2.50, by annual subscription by inland-mail fr. 24.—; other countries fr. 28.—. Prices in Swiss currency.

All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10th of the preceding month.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 200.—, $^1/_2$ page fr. 120.—, $^1/_4$ page fr. 70.—. Advertisements should be sent to the publishers.

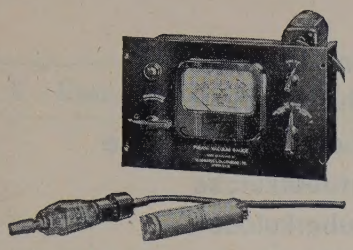
*Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15*
*Phone 49800; Telegrams: Edita Basle*

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

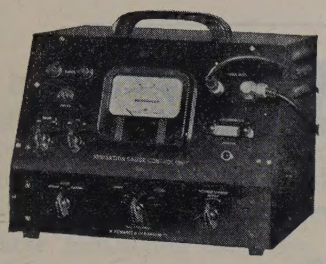


*Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of advertisers – Experientia V/5*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ciba AG., Basel | Schwitter AG., Basel | Trüb, Täuber & Co. AG., Zürich | E. Mettler, Zürich |
| Zivy & Cie., Basel | Specia, Paris | Birkhäuser AG., Basel | Cilag AG., Schaffhausen |



Pirani-Vakuummeter



Ionisationsmanometer

# HOCHVAKUUM-MESSGERÄTE

- Für jeden Bereich, jedes Gebiet das passende Meßaggregat!
- Elektrische Meßgeräte für direkten Anschluß an das Lichtnetz.
- Höchstleistung nur durch Hochvakuum-Spezialisten, also:

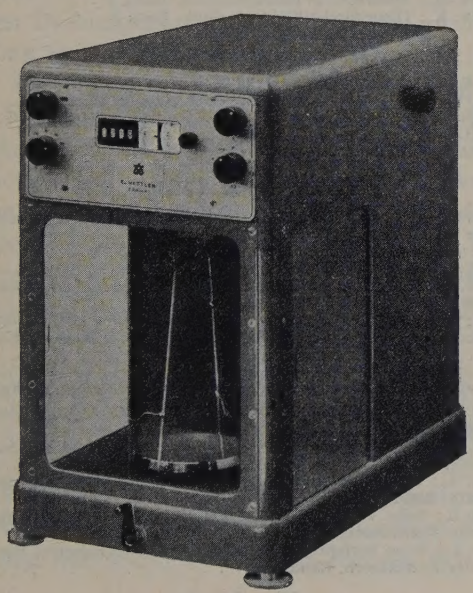
## W. EDWARDS & CO. LTD. LONDON

Kaltkathoden-Ionisationsmanometer
Knudsen-Vakuummeter
McLeod-Manometer
Balgmanometer etc. etc.

Generalvertretung für die Schweiz:

**N. ZIVY & Cie** BASEL

Telephon (061) 2 59 90 Spalenring 164



# METTLER Analysenwaagen

**Genau**
**Schnell**
**Sicher**
**Einfach**

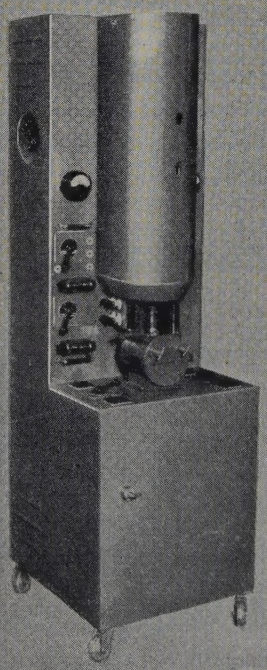
Für sämtliche analytischen und halbmikro-analytischen Arbeiten

Fabrik für Analysenwaagen

**E. METTLER** ZÜRICH

Pelikanstr. 19, Tel. (051) 25 25 70

## Universal-Kathodenstrahloszillograph



Der Oszillograph eignet sich besonders für Stossprüfanlagen und Untersuchungen von Abschaltvorgängen usw.

Seine Hauptdaten sind folgende:
Eingebaute Hochspannungsanlage für 15, 25, 35 und 45 kV.

Empfindlichkeit in V/mm:
für die Zeitachse:
0,55 × Anodenspannung in kV;

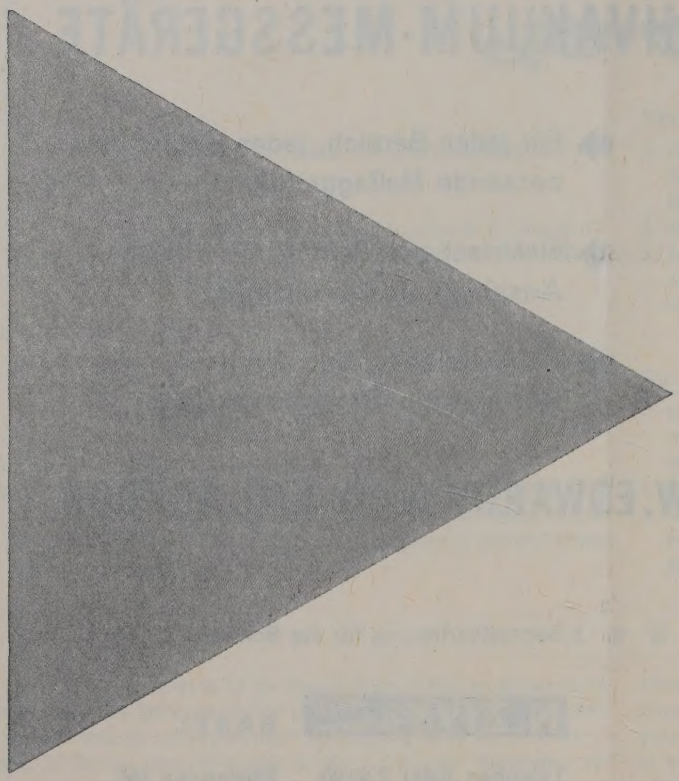
für die Meßspannung:
0,44 × Anodenspannung in kV.

Strichschärfe: 0,03—0,3 mm.
log. Zeitablenkung 1 µs—1000 µs
lin. Zeitablenkung 1000 µs—1 s
einmalig und wiederholt

Einschwingzeit: 0,2 µs
Registrierformat: 6 × 6 cm
Registriervermögen: 10—15 Perioden pro mm.

# Trüb, Täuber & Co. AG.

Fabrik elektrischer Meßinstrumente und wissenschaftlicher Apparate, Zürich



Lungentuberkulose
Bronchialtuberkulose
Kavernen und Empyeme
Nierentuberkulose
Darmtuberkulose
Meningitis tbc
Miliartuberkulose

**PAS-CILAG**

p-Aminosalicylsäure

Packungen:

500 und 1000 Dragées zu 0,3 g
250 und 1000 Tabletten zu 0,5 g
5 und 25 Ampullen zu 10 cc/20%

CILAG AKTIENGESELLSCHAFT SCHAFFHAUSEN

CILAG


# Bücher aus dem Verlag Birkhäuser

*Lehrbücher und Monographien*
*aus dem Gebiete der exakten Wissenschaft*

### MATHEMATIK

ZWINGGI, E.: Versicherungsmathematik . . . . . 27.—
FUETER, R.: Analytische Geometrie der Ebene und des Raumes . 22.50
LINDER, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure . . . . . 18.50
OSTROWSKI, A.: Vorlesungen über Differential- und Integralrechnung, Band 1, Funktionen einer Variablen . . . . . 47.50
OSTROWSKI, A.: Vorlesungen über Differential- und Integralrechnung, Band 2 und 3, Funktionen mehrerer Variablen . . . . . *
STIEFEL, A.: Lehrbuch der darstellenden Geometrie . . . . . 28.50
CARATHÉODORY: Funktionentheorie . . . . . *

### PHYSIK

REICHENBACH, H.: Philosoph. Grundlagen der Quantenmechanik *
GOMBAS, P.: Theorie- und Lösungsmethoden des Mehrteilchenproblems der Wellenmechanik . . . . . *

### CHEMIE

NIGGLI, P.: Grundlagen der Stereochemie . . . . . 32.50
BRANDENBERGER, E.: Röntgenographisch-analytische Chemie . . . 28.50
KARRER, P., und JUCKER, E.: Carotinoide . . . . . 43.—

### EXPERIMENTELLE BIOLOGIE

GÄUMANN, E.: Pflanzliche Infektionslehre . . . . . 48.50
LEHMANN, F. E.: Einführung in die physiologische Embryologie . . 38.—
MURALT, A. VON: Die Signalübermittlung im Nerven . . . . . 38.50
GÄUMANN, E.: Die Pilze, ihre Entwicklungsgesch. und Morphologie 38.—

### MINERALOGIE

MOOS, A. VON, und QUERVAIN, F. DE: Technische Gesteinskunde . 33.—
BURCKHARDT, J. J.: Die Bewegungsgruppen der Kristallographie . 29.—
NIGGLI, P., und NIGGLI, E.: Gesteine und Minerallagerstätten. Band I 46.—

### ASTRONOMIE

PAHLEN, E. VON DER: Einführung in die Dynamik v. Sternsystemen 36.—
NIETHAMMER, TH.: Die genauen Methoden der astronomisch-geographischen Ortsbestimmung . . . . . 32.—
WALDMEIER, M.: Einführung in die Astrophysik . . . . . 47.50

*Lehr- und Handbücher der Ingenieurwissenschaften*

STÜSSI, F.: Vorlesungen über Baustatik . . . . . 38.50
MEISSNER, E., und ZIEGLER, H.: Mechanik, Band 1, Statik . . . . 36.—
MEISSNER, E., und ZIEGLER, H.: Mechanik, Band 2, Dynamik . . . 32.50
JAEGER, CH.: Technische Hydraulik . . . . . 48.50
RUSTERHOLZ, A.: Elektronenoptik . . . . . *
KUHLMANN, K.: Theoretische Elektrotechnik, Band 1 . . . . . *
KUHLMANN, K.: Theoretische Elektrotechnik, Band 2 . . . . . 26.50
KUHLMANN, K.: Theoretische Elektrotechnik, Band 3 . . . . . *

*Wissenschaft und Kultur*

SPEISER, A.: Die mathematische Denkweise . . . . . 14.50
FIERZ-DAVID, H. E.: Die Entwicklungsgeschichte der Chemie . . . 21.50
GAMOW, G.: Geburt und Tod der Sonne . . . . . 24.50
STRAUB, H.: Die Geschichte der Bauingenieurkunst . . . . . *
NIGGLI, P.: Probleme der Naturwissenschaften . . . . . 18.50

*Industrie und Technik*

FIERZ-DAVID, H. E., und MERIAN, E.: Abriß der chemischen Technologie der Textilfasern . . . . . 36.50
COHEN, A.: Rationelle Metallanalyse . . . . . 46.—
STÄGER, H.: Allgemeine Werkstoffkunde . . . . . 46.50
SCHMID, E. V.: Ins Innere von Kunststoffen, Kunstharzen und Kautschuken . . . . . 18.50
MOSER A.: Der Dampfbetrieb der schweiz. Eisenbahnen 1847—1947 30.—
BODEA, E.: Giorgis rationales MKS-Maßsystem mit Dimensionskohärenz . . . . . 24.50

**Neueste Fortschritte und Verfahren in der chemischen Technologie der Textilfasern**

DISERENS, L.: Die neuesten Fortschritte in der Anwendung der Farbstoffe, Band 1 . . . . . 68.—
DISERENS, L.: Die neuesten Fortschritte in der Anwendung der Farbstoffe, Band 2 . . . . . 78.—
DISERENS, L.: Die neuesten Fortschritte in der Anwendung der Farbstoffe, Band 3 . . . . . *
DISERENS, L.: Neue Verfahren in der Technik der chemischen Veredlung der Textilfasern, Band 1 . . . . . 87.50
DISERENS, L.: Neue Verfahren in der Technik der chemischen Veredlung der Textilfasern, Band 2 . . . . . *

*Einzelwerke*

LOCHER-ERNST, L.: Differential- und Integralrechnung im Hinblick auf ihre Anwendung . . . . . 48.—
HURWITZ, A.: Mathematische Werke
Band 1: Funktionentheorie . . . . . 44.—
Band 2: Zahlentheorie, Algebra, Geometrie . . . . . 44.—
SCHLÄFLI, L.: Gesammelte mathematische Abhandlungen . . . . *
THOMMEN, E.: Taschenatlas der Schweizer Flora . . . . . 12.50
KALMUS, H.: Einfache Versuche an Insekten . . . . . *

* In Vorbereitung — * En préparation

*Verlangen Sie unsern neuesten Verlagskatalog und Spezialprospekte der einzelnen Werke*

## Verlag Birkhäuser, Basel

*Sämtliche Bücher können durch die Buchhandlungen bezogen werden*

EXPERIENTIA

Vol. V - Fasc. 5 Pag. 173–220 15. V. 1949

# Chemische und biochemische Untersuchungen über Tumorproteine[1]

Von F. Kögl[2], Utrecht

Der Beginn der Arbeiten, über die hier zu berichten ist, liegt etwas mehr als zehn Jahre zurück. Der Ausgangspunkt war der Gedanke, in den Tumorproteinen nach D-Aminosäuren zu suchen, ein Gedanke, der alsbald über den Charakter einer gewöhnlichen Arbeitshypothese hinausging und den Kern einer Krebstheorie bildete.

Seit Emil Fischers Zeiten schien es evident, daß die Natur für den Aufbau der Proteine anscheinend ausschließlich nur *eine* der beiden Spiegelbildformen der Aminosäuren verwendet. Die Sachlage vereinfachte sich weiterhin durch die Erkenntnis, daß diese Eiweißbausteine am α-C-Atom alle die gleiche räumliche Anordnung der Substituenten aufweisen. Die einschlägigen Untersuchungen, welche von E. Fischer[3], H. Freudenberg[4] sowie vor allem von P. Karrer[5] und Mitarbeitern ausgeführt worden sind, gestatten es, die Eiweißbausteine unabhängig vom jeweiligen Drehungssinn als L-Aminosäuren zu bezeichnen. Das Spiegelbild, die D-Form, wurde auch sonst in der Zelle nicht angetroffen, so daß man sie allgemein die «unnatürliche» Konfiguration nannte. Die erste Ausnahme ist im Jahre 1935 bekanntgeworden, als Jacobs[6] und Craig unter den Spaltstücken von Ergotinin D-Prolin nachwiesen. Zwei Jahre später beschrieben Ivánovics[7] und Bruckner das aus D-Glutaminsäure aufgebaute Polypeptid der Milzbrandbazillen. Seit man sich im Zuge der Untersuchungen über Antibiotika intensiv für die Stoffwechselprodukte niedriger pflanzlicher Organismen interessiert, hat man wiederholt D-Aminosäurebausteine angetroffen. Besonders bekannt ist das Beispiel des D-Dimethylcystein- bzw. D-Valinbausteins der Penicilline. Obschon auch die niedrigen pflanzlichen Organismen auf die L-Aminosäuren eingestellt sind oder diese als Substrat zum mindesten bevorzugen, mehren sich in der letzten Zeit die Anzeichen, daß in ihrem Eiweiß mit dem Auftreten von D-Bausteinen zu rechnen ist[1]. Die Proteine der *höheren* Pflanzen sind vielfach untersucht, und hier steht nur die Frage zur Diskussion, ob neben den L-Bausteinen in manchen Fällen nicht auch ein geringfügiger Prozentsatz an D-Formen auftritt. Während die Proteine niedriger Tierarten in diesem Zusammenhang kaum geprüft sind, kann man jene der höheren Tierarten als die am besten untersuchten Eiweißkörper bezeichnen. Hier läßt sich feststellen, daß in den normalen Gewebeproteinen der *höheren* Tiere bisher kein D-Baustein nachgewiesen werden konnte. Vielleicht darf man die Annahme aussprechen, daß die strenge L-Spezifität der höchstdifferenzierten Organismen entwicklungsgeschichtlich bedingt sein könnte.

Es ist einleuchtend, daß die asymmetrische Synthese der Eiweißbausteine und die Aufrechterhaltung ihrer optischen Reinheit nur durch das Zusammenwirken komplizierter biochemischer Mechanismen ermöglicht wird. W. Kuhn[2] hat 1936 auf Grund einer thermodynamischen und kinetischen Analyse der asymmetrischen Biosynthese das Postulat aufgestellt, daß der Reinheitsgrad optisch aktiver Stoffe im alternden Organismus zwangsläufig sinken müsse.

Als wir 1939 die Stereochemie der Eiweißbausteine in Beziehung zur Krebskrankheit brachten, ließen sich zahlreiche Argumente anführen, die nach unserem Ermessen für einen ursächlichen Zusammenhang sprachen[3]. Am wichtigsten sind nach wie vor die Konsequenzen für die Regulationsmechanismen des Wachstums. Unabhängig davon, ob wir hierbei an hormonale oder enzymatische Wirkungen denken, wird das Auftreten von D-Bausteinen in der Peptidkette der Tumorproteine nicht gleichgültig sein. Die Seitenketten stehen an diesen Stellen entgegengesetzt zur normalen Lage. Dies kann zur Folge haben, daß für ein sich näherndes Wirkstoffmolekül einer der Ankerplätze – z. B. eine Carboxylgruppe – fehlt, oder daß umgekehrt die inverse Seitenkette als Hindernis im Wege steht.

Zur Prüfung der Theorie mußten wir in erster Linie die Tumorproteine durch Erhitzen mit Säuren spalten

[1] Vortrag in der Zürcher und der Basler Chemischen Gesellschaft, gehalten am 19. bzw. 20. Januar 1949. Zugleich 12. Mitteilung über die Chemie der Tumoren.

[2] Organisch-chemisches Laboratorium der Universität Utrecht.

[3] E. Fischer und K. Raske, Ber. Dtsch. chem. Ges. *40*, 3717 (1907).

[4] H. Freudenberg und Mitarbeiter, Ber. Dtsch. chem. Ges. *57*, 1547 (1924).

[5] P. Karrer und Mitarbeiter, Helv. chim. acta *6*, 957 (1925); *18*, 782 (1935).

[6] W. A. Jacobs und L. C. Craig, J. Biol. Chem. *110*, 522 (1935).

[7] C. Ivánovics und V. Bruckner, Z. physiol. Chem. *247*, 281 (1937).

[1] A. S. Konikova und N. N. Dobbert, Chem. Abstr. *42*, 7832 (1948).

[2] W. Kuhn, Z. angew. Chem. *49*, 215 (1936).

[3] F. Kögl und H. Erxleben, Z. physiol. Chem. *258*, 57 (1939) (1. Mitt.).

und dann bei jeder Aminosäure kontrollieren, ob die spezifische Drehung mit jener der reinen L-Form übereinstimmt. Wenn die Aminosäure frei von Begleitstoffen war, konnte aus einer Depression der spezifischen Drehung auf die Anwesenheit der entgegengesetzt drehenden D-Form geschlossen werden. Aber – hier kamen wir unter das Schwert des Damokles. Von einer Reihe von Aminosäuren war nämlich bekannt, daß sie während der Hydrolyse durch das Kochen mit Säure zum Teil razemisieren, wobei also aus der ursprünglich vorhandenen L-Form ein gewisser Prozentsatz an D-Form entsteht. Natürlich ließen wir alle in dieser Hinsicht suspekten Aminosäuren außer Diskussion und beschränkten uns auf jene Eiweißbausteine, welche die Säurehydrolyse ohne nennenswerte Razemisation durchstehen. Letzterer wurde dadurch Rechnung getragen, daß wir bei den isolierten Aminosäuren einen Gehalt von 2% D-Form als Fehlergrenze der Methode betrachteten.

Im allgemeinen zeigte es sich, daß die meisten säurestabilen Aminosäuren auch in den Tumorproteinen nur als L-Form vorhanden waren. Bei einigen Aminosäuren fanden wir einen die genannte Fehlergrenze überschreitenden Gehalt an D-Form; eine wesentliche Abweichung ergab sich jedoch beim *Glutaminsäure*baustein der Tumorproteine. Während *normale* Gewebe praktisch optisch reine L-Glutaminsäure ($[\alpha]_D = +31{,}7°$) lieferten, isolierten wir aus Tumorproteinen Glutaminsäure, deren Drehung eine beträchtliche Depression aufwies. Diese war am größten bei dem besonders malignen Brown-Pearce-Tumor des Kaninchens (20 bis 25% D-Form); bei den mit karzinogenen Kohlenwasserstoffen (z. B. mit Benzpyren) hervorgerufenen Tumoren von Ratten entsprach die Drehung 10–13% D-Form, während das relativ gutartige, nicht metastasierende *Jensen*-Sarkom der Ratte nur eine Glutaminsäure mit 6–8% D-Form lieferte. *Menschliche* Krebsgeschwülste, wie Ovarialkarzinom, Magensarkom, Lebermetastasen, ergaben Glutaminsäure mit 10–25% D-Form, dagegen zeigte sich bei *gutartigen* menschlichen Myomen keine deutliche Abweichung.

Sobald unsere theoretischen Betrachtungen und die experimentellen Befunde Anfang 1939 bekannt wurden[1], wandte man sich in zahlreichen Laboratorien dem neuen Gebiet zu, um die Befunde nachzuprüfen. Während gegen unsere Theorie der malignen Entartung keine ernsten Einwände gemacht werden konnten, wurde unseren experimentellen Ergebnissen alsbald widersprochen. Verschiedene Autoren teilten mit, daß sie auch aus Tumoren nur die gewöhnliche L-Glutaminsäure isolieren konnten. Sehr vereinzelt kamen Bestätigungen unserer Befunde; aber als von anderer Seite immer wieder negative Resultate mitgeteilt wurden, standen wir bald allein. Vergeblich wiesen wir darauf hin, daß viele Opponenten offensichtlich eine andere Versuchsmethodik angewandt haben und daß es ein leichtes sei, bei den Reinigungsoperationen DL-Glutaminsäure in den Mutterlaugen zu verlieren.

In diesem Stadium wäre ein persönlicher Kontakt, ein Austausch von Mitarbeitern, überaus nützlich gewesen, um die Ursachen der gegensätzlichen Befunde aufzuklären. Leider wurde dies durch den Ausbruch des Krieges verhindert. Immerhin erhielten wir in der ersten Zeit noch ausländische Fachliteratur, und so kam 1940 eine amerikanische Untersuchung zu unserer Kenntnis, die in der Tat einen sehr schweren Angriff gegen unsere Versuchsergebnisse enthielt. Graff[1], Rittenberg und Foster synthetisierten DL-Glutaminsäure, die mit dem Stickstoffisotop $N^{15}$ markiert war, und setzten diese den Proteinhydrolysaten zu. Isoliert man dann L- und DL-Glutaminsäure aus dem Gemisch, so wird der $N^{15}$-Gehalt der betreffenden Präparate durch die ursprünglich im Hydrolysat anwesenden Antipoden der Glutaminsäure erniedrigt sein. Auf diese Weise wurde bei 6 Tumoren etwa 10% des Proteingewichts an L-Form nachgewiesen; der Gehalt an D-Form war minimal und unterschied sich praktisch nicht von jenem eines Hydrolysats von normalem Gewebe.

Es zeigte sich bald, daß man in der genannten Arbeit fast allgemein einen überzeugenden Gegenbeweis erblickte. Die Methode der Isotopenverdünnung schien zwangsläufig zu den absoluten Werten zu führen, während wir bisher von der Ausbeute an isolierter Glutaminsäure abhängig waren. Diese betrug anfänglich nur etwa 4% des Proteingewichts, ließ sich aber durch zunehmende Übung auf etwa 9% und bei einem Brown-Pearce-Tumor sogar auf 12,9% an partiell razemischer Glutaminsäure steigern[2], was den Grenzwert der amerikanischen Autoren beträchtlich übertraf. Jedenfalls gaben wir uns nicht geschlagen, und da 1940 das Stickstoffisotop in Europa nicht zugänglich war, arbeiteten wir in der Folgezeit mit schwerem Wasserstoff als Indikator. Im Prinzip mußte die Methode der Isotopenverdünnung natürlich auch mit Deuterioglutaminsäure ausführbar sein. Wir haben auf diese Weise in Dutzenden von Hydrolysaten den Gehalt an L- und D-Glutaminsäure bestimmt. Das Ergebnis[3] war praktisch eine völlige Bestätigung unserer früheren, auf präparativem Wege erhaltenen Befunde über den Razematgrad der verschiedenen Tumortypen. Andererseits ergaben die untersuchten normalen Gewebe – ebenso wie auch der Gesamtorganismus der normalen Ratte – Werte, die innerhalb der früher erwähnten Fehlergrenze lagen. Auffälligerweise betrug jedoch der von uns gefundene Totalgehalt an Glutamin-

[1] F. Kögl und H. Erxleben, Z. physiol. Chem. *258*, 57 (1939) (1. Mitt.).

[1] S. Graff, D. Rittenberg und G. L. Foster, J. Biol. Chem. *133*, 745 (1940).

[2] F. Kögl und H. Erxleben, Z. physiol. Chem. *264*, 198 (1940) (6. Mitt.).

[3] F. Kögl, H. Erxleben und G. J. v. Veersen, Z. physiol. Chem. *277*, 251 (1943) (9. Mitt.).

säure nicht 10%, sondern 12–16% des Proteingewichts. Dies bedeutet, daß sich bei der Arbeitsweise der amerikanischen Autoren außer der D-Form auch ein Teil der L-Form dem Nachweis entzogen hatte.

Die im Jahre 1943 veröffentlichte Deuteriumarbeit hat leider nicht die erwartete Auswirkung gehabt. Von anderer Seite wurden weiterhin negative Ergebnisse mitgeteilt. So erschien Anfang 1944 eine Arbeit von Theodor Wieland[1] und Paul, die in den Besitz von $N^{15}$ gekommen waren und hiermit die Versuche der amerikanischen Autoren wiederholten. Sie fanden bei drei Analysen von Brown-Pearce-Tumoren wiederum nur gegen 10% L-Glutaminsäure neben 0,5% D-Form. Letztere wurde als Artefakt betrachtet, eine Meinung die auch alle anderen Opponenten vertreten hatten. Im besonderen wurde noch auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die von uns angewandte Deuteriummethode durch die größere Labilität der C-D-Bindungen weniger zuverlässig sein könnte.

Natürlich hätten auch wir für unsere Bestimmungen die Verwendung von $N^{15}$ bevorzugt; hierzu ist es jedoch durch die Kriegsereignisse nicht mehr gekommen. So blieb in dieser sehr bedrängten Zeit nur noch die Möglichkeit übrig, die Utrechter Arbeitsweise zur Kontrolle auch in einem anderen Laboratorium zu demonstrieren. Zu Beginn des Jahres 1944 hat meine Mitarbeiterin, Frl. H. Erxleben, im Institut von Hans Fischer einige Tumoren mit dem von uns erwarteten Ergebnis analysiert. Wie mir H. Fischer in einem seiner letzten Briefe noch schrieb, konnte K. Bürger nach den in Gemeinschaft mit H. Erxleben ausgeführten Versuchen hernach auch in zwei unabhängigen Tumoranalysen unsere Ergebnisse bestätigen. H. Erxleben hat durch ihre besondere experimentelle Geschicklichkeit und Energie an der Entwicklung der Arbeiten großen Anteil gehabt. Als die Untersuchungen nach dem Kriege mit weniger erfahrenen Mitarbeitern fortgesetzt werden mußten, traten manche Schwierigkeiten auf. Es ist vor allem das Verdienst von T. J. Barendregt, daß diese überwunden wurden und die früheren Ergebnisse weiterausgebaut werden konnten.

Wir hatten bereits während der Kriegsjahre wichtige Ergebnisse über die Biosynthese des D-Glutaminsäurebausteins der Tumorproteine erhalten. Es schien jedoch zwecklos, diese Befunde zu veröffentlichen, solange immer wieder die analytischen Grundlagen unserer Arbeiten bestritten oder zum mindesten in Zweifel gezogen wurden. Die Gegenseite war von unserem «experimentellen Irrtum» überzeugt, und da wir gegenüber einer großen Mehrheit allein standen, ist es nicht verwunderlich, wenn im allgemeinen auch der neutrale Beobachter die Angelegenheit für erledigt hielt. Unter den gegebenen Umständen mußten wir uns daher auch nach dem Kriege zunächst wieder mit den analytischen Problemen beschäftigen. Es war uns seit langem klar geworden, daß unsere Versuchstechnik in irgendeiner Hinsicht eine Besonderheit aufweisen mußte, die für den Erfolg entscheidend war. Wir suchten früher die Erklärung hauptsächlich bei der Isolierungstechnik. In der Tat ist viel Übung und Erfahrung erforderlich, um das Hydrochlorid der partiell razemischen Glutaminsäure in guter Ausbeute (d. h. mindestens 8% des Proteingewichts an freier Glutaminsäure!) aus den Hydrolysatsirupen zu isolieren. Theoretisch muß nun zwar die Isotopenmethode unabhängig von den Ausbeuten den absoluten Gehalt an beiden Antipoden ergeben. Voraussetzung ist hierfür jedoch eine ideale Mischung, die in dem Gemenge von Aminosäuren nicht unter allen Umständen gewährleistet schien. Die einschlägigen Versuche führten jedoch nicht zu einer befriedigenden Erklärung der Widersprüche.

Es schien jedoch möglich, die ganzen Schwierigkeiten beheben zu können, wenn der Nachweis gelingen sollte, daß unsere Opponenten das Proteingemisch weniger vollständig hydrolysierten, als das bei unserer Arbeitsweise der Fall war. Es sei daran erinnert, daß die anderen Autoren auf Grund der $N^{15}$-Analysen einen Totalgehalt von etwa 10% des Proteingewichts an freier Glutaminsäure *errechneten*, während wir bei einem besonders eingehend untersuchten Brown-Pearce-Tumor 12,9% an analysenreiner, freier Glutaminsäure *isoliert*[1] hatten! Zunächst war es nicht zu begreifen, inwiefern unsere Hydrolysemethode eine Besonderheit aufweisen sollte. Als wir vor 10 Jahren eine geeignete Methode zur Hydrolyse der Gewebeproteine suchten, haben wir uns in einer Übersicht von Max Bergmann[2] Rat geholt, in der u. a. 7stündiges Erhitzen mit dem 3fachen Volumen konz. Salzsäure genannt war. Da wir die Razemisation *in vitro* soviel als möglich vermeiden wollten, schien diese kurze Hydrolyse für unsere Zwecke besonders geeignet zu sein. Als sich später zeigte, daß das 7stündige Erhitzen – besonders bei normalen Geweben – nicht ausreichend ist, sind wir zur 20stündigen Hydrolyse übergegangen. Wir arbeiteten mit einem Ölbad und erwärmten «zum gelinden Sieden». Hierbei entweicht allmählich der überschüssige Chlorwasserstoff und die Reaktionstemperatur schien durch den Siedepunkt der konstant siedenden 20prozentigen Salzsäure definiert. In der Tat beträgt die Temperatur der Reaktionsflüssigkeit 112°, wenn man mit einem Babo-Trichter arbeitet; die heiße Luft außerhalb des Kolbens hat dann eine Temperatur von ungefähr 200°. Erxleben hat jedoch die Temperatur des Ölbads erst langsam auf 135° gebracht und dann im Laufe der weiteren Stunden auf maximal 150–160° gesteigert. Die Reak-

[1] Th. Wieland und W. Paul, Ber. Dtsch. chem. Ges. *77*, 34 (1944).

[1] F. Kögl und H. Erxleben, Z. physiol. Chem. *264*, 198 (1940) (6. Mitt.).

[2] M. Bergmann und L. Zervas in: G. Klein, Hb. d. Pflanzenanalyse (Verlag J. Springer, Wien 1933) III. Teil, S. 299.

*Tabelle I*

Einfluß der Reaktionsbedingungen auf den Hydrolysegrad der Proteine von Benzpyrentumoren (Mittelwerte bei 20stündiger Hydrolyse)

| Badtemperatur | Bad | Reaktions-temperatur | Gefäß | Zugefügte Säure | $\frac{NH_2\text{—}N}{\text{Total-N}}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 135–160° | Öl | im Mittel 116° | Rückfluß-kolben | 3 vol. konz. HCl | 76–79% |
| 200° | Luft | 112° | Rückfluß-kolben | 3 vol. konz. HCl | 69% |
| 118° | Ölthermostat | 118° | Carius-Röhre | 3 vol. 20-proz. HCl | 69% |
| 112° | Ölthermostat | 112° | Carius-Röhre | 3 vol. konz. HCl | 74% |

tionsflüssigkeit zeigt dann nur in Intervallen ein leichtes Aufsieden, und nachträglich fanden wir nun, daß zwischen dem kurzen Aufwallen ein Siedeverzug auftritt; in diesen Perioden steigt die Temperatur einige Grade und sinkt dann während des «gelinden Siedens» wieder auf 112°. Auf diese Weise beträgt die mittlere Reaktionstemperatur 116° und nicht 112° wie beim Kochen auf dem Luftbad.

Es mußte nun natürlich geprüft werden, ob der Hydrolysegrad durch die genannten Versuchsbedingungen beeinflußt wird. Zu diesem Zweck wurden die Proteine von Benzpyrentumoren auf verschiedene Weise hydrolysiert und die durch die Spaltung der Peptidbindungen frei werdenden $NH_2$-Gruppen nach VAN SLYKE bestimmt. Die Ergebnisse sind in der obigen Tabelle I zusammengestellt, welcher die Untersuchung von etwa 100 Hydrolysaten zugrunde liegt.

Wie man sieht, ist der Hydrolysegrad bei unserer üblichen Arbeitsweise etwa 9% höher als beim gewöhnlichen Kochen am Luftbad. Diese Differenz ist ungefähr viermal so groß als zur Erklärung unserer höheren Werte an Totalglutaminsäure erforderlich ist. Daß der höhere Hydrolysegrad nicht durch einen höheren Ammoniakgehalt – also durch größere Zersetzung – vorgetäuscht wird, ergab sich aus unabhängigen $NH_3$-Bestimmungen; der Quotient $\frac{NH_3\text{–}N}{\text{Total-N}}$ zeigte nur eine Zunahme von 0,9%.

Aus der dritten Versuchsserie geht hervor, daß der Hydrolysegrad bei Verwendung von 20prozentiger Salzsäure durch eine Temperaturerhöhung auf 118° praktisch nicht beeinflußt wird. Die vierte Hydrolyseart zeigt die große Bedeutung der Salzsäurekonzentration; immerhin wird auch hier nicht ganz der Hydrolysegrad erreicht, den wir bei unserer üblichen Arbeitsweise erzielen.

Wir haben somit bei unseren Untersuchungen unvorhergesehener Weise eine besonders wirksame Hydrolysemethode angewandt, während unsere Opponenten vermutlich durchwegs nach dem an zweiter Stelle angeführten Verfahren gearbeitet haben, bei dem der überschüssige Chlorwasserstoff rasch entweicht. Auf diese Weise erhielten auch wir nur einen Totalwert von durchschnittlich 10,5% Glutaminsäure mit einem unbeträchtlichen Gehalt an D-Form. Die Frage, warum die D- bzw. die DL-Glutaminsäure bei der milderen Hydrolyse nicht oder wenigstens nur unvollständig freigesetzt wird, ist vorläufig noch nicht zu beantworten. Es sei daran erinnert, daß wir beim Übergang von der 7- zur 20stündigen Hydrolyse den gleichen D-Gehalt, aber höhere L-Werte fanden; der D-Gehalt ist also nicht proportional der Hydrolysedauer. Außer rein chemischen Ursachen – schwieriger spaltbare Bindungen, vielleicht in gewissen Ringstrukturen – könnte auch das Vorhandensein von schwerer angreifbarem Struktureiweiß verantwortlich sein. Man darf nicht außer acht lassen, daß zwar unnennbar viel Hydrolysen von gewöhnlichen Proteinen beschrieben sind, daß aber über die Hydrolyse von Gewebe bzw. von Zellbruchstücken sehr viel weniger Erfahrungen vorliegen. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, daß wir Polypeptide, die durch partielle Verdauung von Tumorproteinen erhalten wurden, trotz hohen Gehalts an D-Form bereits durch gewöhnliches Kochen mit Salzsäure gut spalten konnten.

Es ist nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß wir – unter sinngemäßen Bedingungen – zahlreiche Versuche über die Razemisierbarkeit der L-Glutaminsäure ausgeführt haben. Beim 20stündigen Erhitzen mit konz. Salzsäure in der Carius-Röhre auf 115° und auch unter extremen Bedingungen – Erhitzen mit 20prozentiger Salzsäure auf 130° – ergab sich, daß die Razemisierung weit unterhalb der Fehlergrenze lag, mit der wir stets gerechnet haben. Im letzteren Fall wurde dieses Ergebnis auch mit Hilfe der Isotopenmethode bestätigt.

Die Aufgabe, mittels der Methode der Isotopenverdünnung verschiedene Tumortypen und verschiedene Normalgewebe sowie ihre löslichen und unlöslichen Fraktionen, nach den unterschiedlichen Hydrolyse-

*Tabelle II*

$D_2O$-Tränkversuche bei Ratten mit Chemotumoren

I: Benzpyrentumoren ( 5 Ratten). – II: Benzpyrentumoren (11 Ratten). – III: Methylcholanthrentumoren (4 Ratten)

| Nr. | Versuchsdauer | Atom-% Deuterium im Blut | Gewebe | Atom-% Deuterium im Glutaminsäurebaustein | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | L-Form | D-Form |
| I | 7 Tage | 1,42 ± 0,01 | Leber | 0,45 ± 0,02 | |
| | | | Tumor | 0,44 ± 0,01 | *0,06* ± 0,03 |
| II | 12 Tage | 1,63 ± 0,02 | Leber | 0,51 ± 0,01 | |
| | | | Tumor | 0,51 ± 0,01 | *0,23* ± 0,03 |
| III | 17 Tage | 1,37 ± 0,02 | Leber | 0,45 ± 0,01 | |
| | | | Tumor | 0,48 ± 0,01 | *0,48* ± 0,03 |

verfahren systematisch zu analysieren, stellt für ein einzelnes Institut ein Arbeitsprogramm von Jahren dar. Vielleicht werden sich aber in der Zukunft auch für die Bestimmung von D-Glutaminsäure mikrobiologische Verfahren verwenden lassen; ein Anlauf hierzu liegt bereits vor[1]. Bezüglich der neueren Arbeitsmethoden sei noch erwähnt, daß die hervorragende Methode der Verteilungschromatographie von Consden[2], Gordon, Martin und Synge in unserem Laboratorium z. B. zur Kontrolle der Reinheit der Aminosäurepräparate fortwährend Anwendung findet. Übrigens haben wir die Methode durch Verwendung von Papiersäulen auch in präparativem Maßstab ausgeführt. Unter Verwendung von Butanol-$NH_3$ als fließender Phase konnten die Dicarbonsäuren von den übrigen Aminosäuren abgetrennt werden, während die Fraktionierung von Glutaminsäure und Asparaginsäure mit Hilfe von Phenol-$NH_3$ erfolgte. Die Methode lieferte die partiell razemische Glutaminsäure in guter Ausbeute, ist aber in der bisherigen Ausführungsform noch zu umständlich, um mit dem gewöhnlichen Isolierungsverfahren konkurrieren zu können.

Unsere biochemischen Untersuchungen hatten ein doppeltes Ziel. Zunächst galt es, positive Beweise dafür zu erbringen, daß der D-Glutaminsäurebaustein bereits *in vivo* in den Tumoren anwesend ist. Andererseits bestand die Hoffnung, auf diesem Wege einen Einblick in die enzymatischen Vorgänge zu erhalten, die zur Störung der normalen Prozesse führen.

Durch die Markierung mit Isotopen der Bioelemente hat man in den letzten zehn Jahren einen Einblick in die enorme Dynamik bekommen, mit der fast alle Stoffe des Organismus einem fortwährenden Abbau und Wiederaufbau unterliegen. Aus den Untersuchungen amerikanischer Autoren – vor allem von R. Schoenheimer[3] und seiner Schule – ist bekannt, welche Rolle diese Prozesse insbesondere auch bei den Proteinen spielen. Wir waren daher seit langem darauf bedacht, die durch die Isotopentechnik gegebenen Möglichkeiten auf das Problem der Tumorproteine anzuwenden. Wie verhält sich hier der D-Glutaminsäurebaustein im Vergleich zur L-Form? Über diese Frage liegen fünf bisher unveröffentlichte Arbeiten von A. J. Klein, H. Erxleben und G. J. van Veersen vor; die wichtigsten Ergebnisse werden im folgenden kurz angeführt.

Die erste Arbeit bezieht sich auf Versuche, bei denen die Körperflüssigkeit von Tumorratten auf einen Deuteriumgehalt von etwa 1,5 Atom-% gebracht wurde. Dies erfolgte nach dem Vorbild von Foster[1], Rittenberg und Schoenheimer zu Beginn des Versuchs durch Injektion entsprechender Mengen $D_2O$ und hierauf durch Tränken mit Wasser von 2,5 Atom-% Deuterium. Tabelle II zeigt das Ergebnis von drei Versuchsserien.

Wie man sieht, wird Deuterium in den D-Glutaminsäurebaustein langsamer eingebaut als in die L-Form von Tumor und Leber.

In der folgenden Arbeit wurde das Natriumsalz von DL-Deuterioglutaminsäure einer geeigneten Grunddiät zugefügt.

*Tabelle III*

Verfütterung von Mononatriumsalz der DL-Deuterioglutaminsäure (7,5 Atom-%) an Ratten mit Benzpyrentumoren (Fehlergrenze bei D-Formen ± 0,03 Atom-%)

| Versuchsdauer | Atom-% Deuterium der isolierten Aminosäuren | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | aus den Lebern | | aus den Tumoren | | |
| | L-GS | L-AS | L-GS | D-GS | L-AS |
| 5 Tage | 0,02 | 0,12 | 0,03 | *0,15* | 0,09 |
| 15 Tage | 0,01 | 0,04 | 0 | *0,32* | 0,17 |

[1] M. S. Dunn, M. N. Camien, S. Shankman und H. Block, J. Biol. Chem. *168*, 43 (1947).

[2] R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. *38*, 224 (1944).

[3] R. Schoenheimer, S. Ratner und D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *130*, 703 (1939) und weitere Mitteilungen.

[1] G. L. Foster, D. Rittenberg und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. *125*, 13 (1938).

In der dritten Arbeit wurde in fünf Versuchsserien Natrium-deuterio-glutamat subkutan injiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. IV zusammengestellt.

*Tabelle IV*

Injektion von Natrium-deuterio-glutamat in Ratten mit Benzpyrentumoren

Versuchsdauer 4 Tage. Zweimal pro Tag je 200 mg DL-GS (bzw. 100 mg bei den Antipoden) pro Ratte. I und III je 6 Ratten, II, IV und V je 5 Ratten. Fehlergrenze bei D-Formen ± 0,03 Atom-%.

| Nr. | Injektion Na-Salz von GS | | Hydrolysedauer | Atom-% der isolierten Aminosäuren | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | aus den Lebern | | aus den Tumoren | | |
| | Form | Atom-% | | L-GS | L-AS | L-GS | D-GS | L-AS |
| I | DL- | 4,6 | 7 | 0,03 | — | 0,03 | *0,27* | — |
| II | DL- | 5,8 | 7 | 0,14 | 0,19 | 0,11 | *0,36* | — |
| III | DL- | 5,0 | 20 | 0,11 | 0,29 | 0,14 | *0,40* | 0,13 |
| IV | L- | 4,6 | 20 | 0,06 | 0,22 | 0,06 | *0* | 0,19 |
| V | D- | 4,4 | 20 | 0,01 | 0,10 | 0,04 | *0,50* | 0,05 |

Wie bei den Fütterungsversuchen zeigt sich auch nach der Injektion ein erhöhter Deuteriumgehalt der D-Form; dieser Effekt ist hier bereits nach vier Tagen sehr ausgeprägt. Besonders eindrucksvoll ist das unterschiedliche Ergebnis bei der Injektion der Antipoden in der vierten und fünften Versuchsserie.

Bei der folgenden Untersuchung haben wir in analoger Weise das Natriumsalz von DL-Deuterioasparaginsäure injiziert:

*Tabelle V*

Injektion von Natrium-DL-deuterio-aspartat in Ratten mit Benzpyrentumoren

Zweimal pro Tag je 200 mg DL-AS pro Ratte.
I: 6 Ratten. II: 4 Ratten. Fehlergrenze bei D-Formen: ± 0,03 Atom-%

| Nr. | Injektion Na-Salz von DL-AS Atom-% | Versuchsdauer in Tagen | Atom-% in den isolierten Aminosäuren | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | aus den Lebern | | aus den Tumoren | | |
| | | | L-GS | L-AS | L-GS | D-GS | L-AS |
| I | 3,5 | 4½ | 0 | 0,05 | 0,01 | *0,12* | 0,09 |
| II | 3,75 | 8 | 0,05 | 0,22 | 0,02 | *0,34* | 0,06 |

In der letzten Arbeit dieser Reihe wurde DL-Deuterioalanin injiziert. Zur Darstellung der deuterierten Aminosäuren haben wir durchwegs die entsprechenden Ketoverbindungen nach der KNOOPschen Reaktion in ammoniakalischer Lösung mit $D_2$ und Pd hydriert.

Der erstgenannte Injektionsversuch ist 1944 von ERXLEBEN, der zweite vier Jahre später von BARENDREGT ausgeführt worden.

*Tabelle VI*

Injektion von DL-Deuterio-alanin in Ratten mit Benzpyrentumoren. Zweimal pro Tag je 200 mg DL-Alanin pro Ratte. Versuchsdauer 8 Tage. I: 5 Ratten; II: 4 Ratten. Fehlergrenze bei D-Formen: ± 0,03 Atom-%

| Nr. | Injektion DL-Alanin Atom-% | Atom-% in den isolierten Aminosäuren | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | aus den Lebern | | aus den Tumoren | | |
| | | L-GS | L-AS | L-GS | D-GS | L-AS |
| I | 4,5 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | *0,48* | 0 |
| II | 5,2 | 0,05 | 0,03 | 0,08 | *0,66* | 0,01 |

Als Gesamtergebnis der biochemischen Deuteriumversuche läßt sich feststellen, daß sich der D-Glutaminsäurebaustein hinsichtlich des Einbaus von Deuterium durchwegs anders verhält als die L-Form. Wäre die D-Glutaminsäure wirklich erst *in vitro* durch Razemisierung entstanden, so müßte sie natürlich im Isotopengehalt der L-Form entsprechen, eine L-Glutaminsäure mit 0,08 Atom-% kann bei der Razemisierung niemals eine D-Form mit 0,66 Atom-% liefern! Noch wichtiger als diese analytische Konsequenz sind für die Zukunft die Schlußfolgerungen, welche aus den Ergebnissen über die Biosynthese der D-Glutaminsäure zu ziehen sind. Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß diese unabhängig von jener des L-Antipoden erfolgt, doch dürfte es verfrüht sein, heute bereits weitere Konsequenzen zu diskutieren.

Auch eine zweite biochemische Arbeitsrichtung hat einen strikten Beweis dafür erbracht, daß die aus den Tumorproteinen isolierte D-Glutaminsäure kein Artefakt ist. Nach unseren Auffassungen war zu erwarten, daß die Tumorproteine durch die normalen Enzyme nicht völlig verdaut werden. Es schien uns wichtiger, dies zunächst durch Verdauungsversuche *in vivo* zu prüfen, da man dann die Sicherheit hatte, daß alle Enzyme *in optima forma* zur Einwirkung kamen. In der Tat konnten nach Verfütterung von gekochten Tumoren aus Harn und Faeces von Hunden Polypeptide mit hohem Gehalt an D-Glutaminsäurebaustein isoliert werden[1]:

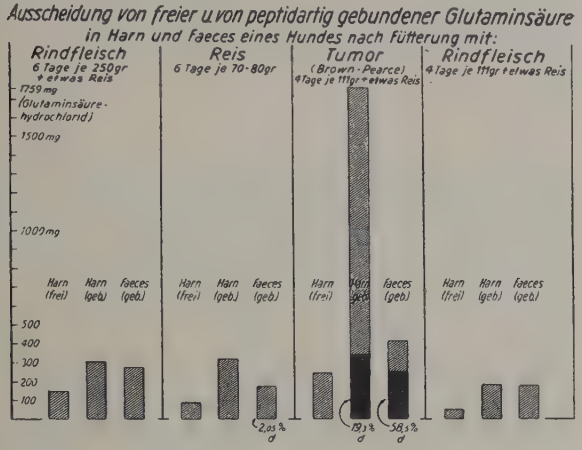
*Tabelle VII*

Verfütterung von gekochten Tumoren an normale Hunde
I und II: H. ERXLEBEN (1940); III: T. J. BARENDREGT (1948).

| Nr. | Tumor $\left(\frac{\text{D-GS}}{\text{Total-GS}}\right)$ | Gehalt der isol. GS an D-Form nach Hydrolyse der Polypeptide | |
|---|---|---|---|
| | | aus Harn | aus Faeces |
| I | Brown-Pearce (25%) | 16,9% | 53,1% |
| II | Brown-Pearce (25%) | 19,3% | 56,8% |
| III | Benzpyren (13%) | 8,8% | 33,5% |

[1] F. KÖGL und H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. *264*, 108 (1940) (5. Mitt.).

Der Vergleich mit anderen Diäten ergibt sich aus folgender Abbildung.




Durch eine Arbeit von S. Ratner[1] ist 1944 bekanntgeworden, daß die Ratte nach Fütterung von D-Glutaminsäure im Harn deren Lactam, die D-Pyrrolidon-carbonsäure ausscheidet. Dieser unvorhergesehene Befund veranlaßte uns, auch in dem nach Fütterung von Benzpyrentumoren ausgeschiedenen Harn des Hundes nach dieser Verbindung zu suchen. In der Tat gelang es, aus dem Äthylacetatextrakt optisch reine D-Pyrrolidoncarbonsäure ($[\alpha]_D = +11{,}2°$) zu isolieren[2]. In einem folgenden Versuch fütterten wir normale Ratten mit den Proteinen von Rattentumoren, die durch Benzpyren hervorgerufen waren. Auch hier trat im Harn D-Pyrrolidoncarbonsäure auf, die wir in diesem Falle unmittelbar in Glutaminsäure umsetzten. Nach der spez. Drehung ($[\alpha]_D = -31{,}5°$) lag auch hier die optisch reine D-Form vor. Schätzungsweise werden etwa 10% des im Tumoreiweiß vorhandenen D-Glutaminsäurebausteins in der Form des Lactams ausgeschieden. Da im Magendarmkanal nicht mit Salzsäure gekocht wird, wird der Behauptung, daß die D-Form künstlich entstehe, allein bereits durch die zuletzt genannten Befunde der Boden entzogen.

Zum Schluß ist noch über Versuche mit radioaktiver Glutaminsäure zu berichten. J. Halberstadt hat zunächst radioaktives Bariumcarbonat (Oak Ridge) nach den Angaben von Melville[3] und Mitarbeitern in Natriumformiat* umgesetzt und hieraus auf folgendem Wege Glutaminsäure* synthetisiert:

$$BaC^*O_3 \xrightarrow{H^+} C^*O_2 \xrightarrow{NaOH} NaHC^*O_3 \xrightarrow{H_2,Pd} HC^*OONa \xrightarrow{440^0}$$

$$(C^*OONa)_2 \xrightarrow{AgNO_3} (C^*OOAg)_2 \xrightarrow{CH_3J} (C^*OOCH_3)_2$$

$$\begin{array}{l} CH_2-COOCH_3 \\ | \\ CH_2-COOCH_3 \end{array} \xrightarrow{KOCH_3} \begin{array}{l} CH_2-COOCH_3 \\ | \\ C-COOCH_3 \\ \| \\ KO-C^*-C^*OOCH_3 \end{array} \xrightarrow{HCl}$$

$$+ \quad (C^*OOCH_3)_2$$

[1] S. Ratner, J. Biol. Chem. *152*, 559 (1944).
[2] F. Kögl, T. J. Barendregt und A. J. Klein, Nature *162*, 732 (1948).
[3] D. B. Melville, J. R. Rachele und E. B. Keller, J. Biol. Chem. *169*, 419 (1947).

$$\begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ O=C^*C^*OOH \end{array} \xrightarrow[NH_3]{H_2,\,Pd} \begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ H_2N-C^*H-C^*OOH \end{array}$$

Die im α-Carboxyl und in der α-Stelle mit $C^{14}$ markierte Glutaminsäure wurde in der üblichen Weise in die Antipoden gespalten.

Nun hatten Shemin[1] und Rittenberg $B_2$-avitaminotische Ratten mit DL-Glutaminsäure gefüttert, die durch $N^{15}$ markiert war. Es wurde bereits erwähnt, daß hierbei im Harn D-Pyrrolidoncarbonsäure auftritt; die hieraus gewonnene D-Glutaminsäure zeigte den gleichen $N^{15}$-Gehalt wie die verfütterte Verbindung. Die amerikanischen Autoren folgerten hieraus, daß im Organismus der $B_2$-avitaminotischen Ratte und demnach wahrscheinlich auch im normalen Tier keine D-Glutaminsäure synthetisiert wird, da diese durch Mischung den Isotopengehalt herabgesetzt hätte.

Man erkennt, daß hierdurch für unser Problem ein *experimentum crucis* auszuführen war. Wenn verfütterte oder injizierte radioaktive D-Glutaminsäure im Tumor nicht rein additiv eingebaut wurde, sondern die genuine D-Form teilweise verdrängte, dann mußte sich dies bei der im Harn ausgeschiedenen D-Pyrrolidoncarbonsäure bzw. der daraus zu gewinnenden D-Glutaminsäure durch eine Herabsetzung der Radioaktivität manifestieren. Ob der Effekt meßbar sein würde, hing natürlich nicht zuletzt von einem günstigen Verhältnis zwischen zugeführter und zelleigener D-Glutaminsäure ab.

*Tabelle VIII*

Injektion von radioaktivem Natrium-D-glutamat bei normalen Ratten und Ratten mit Benzpyrentumoren[2].

I. Periode: An 4 Tagen pro Ratte und Tag je 25 mg D-GS* (als Natriumsalz injiziert)

| Messungstage | Vergleich der Radioaktivität von $BaC^*O_3$ (durch Umsetzung von D-GS*HCl erhalten) | | |
|---|---|---|---|
| | Na-Salz der Ausgangs D-GS | aus Harn von *normalen* Ratten | aus Harn von *Tumor*ratten |
| 6. 12. 48 | 100% | 97,8% | *87,4%* |
| 7. 12. 48 | 100% | 97,8% | *88,0%* |

II. Periode: Während 2 Tagen keine Injektion.
III. Periode: An 4 Tagen pro Ratte und Tag je 100 mg D-GS* (als Natriumsalz injiziert).

| | | | |
|---|---|---|---|
| Mittelwert von 4 Messungstagen: | 100% | 100,7% | *94,8%* |

[1] D. Shemin und D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *151*, 507 (1943).
[2] Diät: Amylum oryzae, gekochtes Rindfleisch, Lebertran, wasserlösliche Vitamine, Salzgemisch.

Barendregt und Halberstadt haben zwei normalen Ratten und zwei Ratten mit Benzpyrentumoren unter genau den gleichen Versuchsbedingungen radioaktives Natrium-D-glutamat injiziert. Aus dem Harn wurde in der schon beschriebenen Weise D-Glutaminsäure isoliert. Die Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Präparate erfolgte im Kernphysikalischen Institut Amsterdam, wobei uns A. H. W. Aten jr. mit Rat und Hilfe zur Seite stand. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. VIII zusammengestellt.

Nach der dritten Periode wurde die Glutaminsäure aus den Tumorproteinen isoliert und die Radioaktivität der Antipoden verglichen. Während jene der L-Form kaum höher als die spontanen Ausschläge lag, zeigte die D-Form 8,9% der Radioaktivität des injizierten Präparats. Die L-Glutaminsäure aus den Leberproteinen war nicht radioaktiv. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit jenen des entsprechenden Deuteriumversuchs (vgl. Tab. IV, Nr. V).

Natürlich ist dies erst ein Beginn, aber im Rahmen der übrigen Beweisführung läßt sich heute schon sagen, daß die Erniedrigung des Isotopengehalts in der D-Glutaminsäure des Tumorharns ein für die künftige Forschung wichtiges Ergebnis ist, das zu zahlreichen neuen Versuchen anregt. Abgesehen von der Ausdehnung auf andere Tumorarten und andere Organismen wird man sich bemühen, die Versuchstechnik zu vervollkommnen. Hierzu liegen verschiedene Möglichkeiten vor der Hand, wie z. B. durch Variation von Versuchsdauer und Dosierung bei Injektion und Fütterung. Weitaus am wichtigsten ist jedoch sicherlich die Verwendung der genauesten Methoden zur Isotopenbestimmung, wobei wohl von der Entwicklung der massenspektrometrischen Versuchstechnik am meisten zu erwarten ist. Es wäre natürlich außerordentlich wichtig, wenn sich das neue Prinzip später für diagnostische Zwecke verwenden ließe. Die Zukunft muß entscheiden, ob dies realisierbar ist oder ob diese Hoffnung eine Utopie bleibt.

Als ich vor zehn Jahren über unsere ersten Ergebnisse sprach, habe ich die Äußerung eines englischen Arztes zitiert. Nach dieser sind bei einer medizinischen Entdeckung drei Perioden zu unterscheiden: in der ersten wird die Richtigkeit, in der zweiten die Wichtigkeit bestritten. Läßt sich schließlich beides nicht mehr in Abrede stellen, dann heißt es, daß die Entdeckung altbekannt sei.

Es war sehr schwer, zehn Jahre gegen den Strom anzukämpfen. Wenn nun in der Tat die «zweite Periode» beginnt, so hoffe ich, daß wir in dieser nicht wiederum allein stehen werden.

*Summary*

In 1939 a theory on malignancy has been published which was based on the experimental evidence that D-glutamic acid is a characteristic constituent of tumour proteins. However, other authors were unable to confirm the experimental results; they found only L-glutamic acid and considered the D-form as an artefact. Both views have been checked by the isotope dilution method, using $N^{15}$ and deuterium respectively. The results were again contradictory.

(1) It is now pointed out that many negative results may have been caused by a less complete hydrolysis, the concentration of the hydrochloric acid being an important factor.

(2) Meanwhile numerous biochemical experiments have been carried out which give unequivocal evidence that D-glutamic acid is a constituent of tumour proteins. In the first investigation the deuterium content of the body fluids of tumour bearing rats was raised to 1·5 atom p. c. Furthermore feeding experiments with DL-deuterio-glutamic acid have been carried out and in a following group of investigations deuterium labeled monosodium glutamate and aspartate as well as deuterioalanine have been injected. The results of all these experiments demonstrated that the biosynthesis of L- and D-glutamic acid is accomplished by different pathways.

(3) The normal dog is unable to digest tumour proteins in the same way as common meat. In the former case urine and fæces contain polypeptide fractions which on hydrolysis yield glutamic acid with a high content of D-form. Moreover, the urine contains optically pure D-pyrrolidone carboxylic acid. This compound was also isolated from the urine of normal rats after feeding with tumour proteins of rats.

(4) Radioactive ($C^{14}$ labeled) DL-glutamic acid has been synthesized and resolved.

(5) After injection of $C^{14}$-labeled sodium D-glutamate normal rats excrete D-pyrrolidone carboxylic acid which delivers D-glutamic acid with practically the same radioactivity as the injected material. The same experiment was carried out with tumour-(benzpyrene) bearing rats. In this case the isolated D-glutamic acid showed a definite diminution of the radioactivity. This is a new decisive proof for the production of D-glutamic acid in the living tumour cells.

Grateful acknowledgment is made to the Rockefeller Foundation for the support of our work.

# Aussichten einer Tiefentherapie mit schnellen Elektronenstrahlen

Von R. GLOCKER[1], Stuttgart

Von den durchdringenden Strahlungen der Physik haben bisher nur die Röntgenstrahlen und die radioaktiven $\gamma$-Strahlen, die beide zur Klasse der elektromagnetischen Schwingungen gehören, eine medizinische Anwendung zur Behandlung tiefliegender Krankheitsherde gefunden. Im Zuge der atomphysikalischen Forschung wurden einerseits neue Strahlungen entdeckt, wie z. B. die Protonen- und Neutronenstrahlen, andererseits die Erzeugungsbedingungen für bekannte Strahlungen, wie z. B. die Elektronenstrahlen, so verbessert, daß das Durchdringungsvermögen wesentlich gesteigert werden konnte. Es liegt die Frage nahe, zu überlegen, welche Möglichkeiten sich aus dieser Entwicklung für die Strahlentherapie ergeben.

Elektronenstrahlen, Protonenstrahlen, Neutronenstrahlen sind «Korpuskularstrahlen». Diese bestehen, wie schon der Name sagt, aus einzelnen Teilchen, deren Geschwindigkeit von der Höhe der erzeugenden Spannung abhängt. Alle drei Teilchenarten sind Bausteine der Atome. Nach den RUTHERFORD-BOHRschen Vorstellungen von der Atomstruktur ist das von einem Atom eingenommene Volumen keineswegs gleichmäßig von Materie erfüllt. Das Atom besteht aus einzelnen, sehr kleinen Körperchen, die durch ungeheure leere Räume voneinander getrennt sind. Praktisch ist die ganze Masse des Atoms in einem zentralen Körper vereinigt, der «Atomkern» genannt wird. Nach Art eines Planetensystems kreisen um diesen Kern eine Anzahl von Elektronen, welche die Atomhülle bilden. Die Elektronen sind die Träger der kleinsten in der Natur vorkommenden Elektrizitätsmenge, der sogenannten «Elementarladung»; ihre Masse ist rund 1800mal kleiner als die des leichtesten Atoms, des Wasserstoffatoms. Die Zahl der Elektronen eines Atoms ist gleich der Ordnungszahl des betreffenden Elements im periodischen System und daher bekannt. Im Normalzustand ist das Atom elektrisch neutral. Da die Elektronen immer negativ elektrisch geladen sind, muß der Kern ebenso viele positive elektrische Ladungen haben, als die Zahl der ihn umgebenden Elektronen beträgt.

Das erste Element des periodischen Systems ist Wasserstoff mit dem Atomgewicht 1. Die Hülle des Wasserstoffatoms enthält somit ein Elektron und sein Kern besitzt eine positive elektrische Ladung. Die Masse des Kerns, gemessen in der Atomgewichtsskala, ist 1. «Proton» wird der Kern eines Wasserstoffatoms genannt; dasselbe Teilchen ohne elektrische Ladung heißt «Neutron». Eines der wichtigsten Ergebnisse der neuen Physik ist die Feststellung, daß die Atomkerne zusammengesetzte Gebilde sind und daß es nur zwei Arten von Bausteinen gibt, Protonen und Neutronen (HEISENBERG).

Protonen- und Neutronenstrahlen kommen in der Natur frei nicht vor, sondern müssen immer erst durch Atomspaltprozesse künstlich hergestellt werden. Bei Beschießung von Atomkernen mit energiereichen Teilchen, z. B. mit $\alpha$-Teilchen des Radiums, wird das Gefüge des Kerns gelockert und einzelne Bausteine in Freiheit gesetzt. Ein von einem $\alpha$-Teilchen getroffener Stickstoffkern verwandelt sich in einen Sauerstoffkern und sendet dabei ein Proton aus (RUTHERFORD). Ein Berylliumkern emittiert unter ähnlichen Bedingungen ein Neutron und geht in einen Kohlenstoffkern über (JOLIOT-CURIE). Das Zyklotron von LAWRENCE[1], das mit Hilfe von mit elektrischen Feldern geladenen Teilchen sehr hohe Energien zu verleihen gestattet, und die Uranbrenner («pile»), die zur Gewinnung von Atomenergie dienen, sind solch intensive Strahlungsquellen für Protonen- und Neutronen, daß alle technischen Voraussetzungen zur Anwendung in der Medizin erfüllt sind. Wie sind nun aber die Aussichten einer solchen Therapie?

Die Neutronenstrahlen nehmen gegenüber der bekannten Wirkung von Elektronen- und Röntgenstrahlen eine gewisse Sonderstellung ein. Treffen Elektronen- oder Röntgenstrahlen auf ein Atom, so spielt sich der Vorgang der Absorption in der Elektronenhülle des Atoms ab. Ein Elektron wird ausgestoßen; das Atom wird ionisiert. Das losgelöste, mit beträchtlicher Energie versehene Elektron verursacht dann beim Stoß auf andere Atome physikalische und chemische Wirkungen. Das Neutron als ungeladenes Teilchen durchquert dagegen ungehindert die Elektronenhülle eines Atoms und wird nur in dem seltenen Fall eines Zusammenstoßes mit dem Atomkern abgebremst. Deshalb ist das Durchdringungsvermögen der schnellen Neutronen außerordentlich groß. Der durch den Aufprall in Bewegung gesetzte Atomkern überträgt beim Stoß auf andere Atome die Energie des Neutrons. In besonders hohem Maße ist dies der Fall, wenn leichte Wasserstoffkerne von Neutronen getroffen werden.

Bei gleicher physikalischer Dosis, d. h. bei gleicher auf die Volumeneinheit des Gewebes übertragener Energie, ist die biologische Wirksamkeit von Röntgen- und Neutronenstrahlen je nach der Art des biologischen Vorgangs sehr verschieden. Bei Genmutationen sind Röntgenstrahlen doppelt so wirksam (ZIMMER und

[1] Röntgeninstitut, Technische Hochschule Stuttgart.

[1] E. O. LAWRENCE, Radiology *29*, 313 (1937).

Timoféeff-Ressovsky)[1]; für Chromosomen und Chromatidbrüche kehrt sich das Verhältnis um. Bei Versuchen an höheren Pflanzen und Tieren ist die biologische Wirksamkeit der Neutronenstrahlen durchweg größer, z. B. 10fach bei der völligen Wachstumshemmung von Bohnenkeimlingen (Gray, Read und Mottram)[2] oder 15fach bei der Abtötung von Mäusen durch Langzeitbestrahlung (Gray)[3]. Die Unterschiede in der Wirksamkeit von Neutronen- und Röntgenstrahlen auf verschiedene Zellarten ließen vermuten, daß sich vielleicht bei einer Neutronentherapie die Empfindlichkeit der Karzinomzelle und der gesunden Zelle stärker differenzieren würde, als es bisher in der Röntgentherapie der Fall war. Diese Hoffnungen haben sich nicht erfüllt, wie aus einem kürzlich erschienenen Bericht von Stone[4] über 250 Krebsfälle mit 4- bis 7jähriger Beobachtungsdauer der Patienten deutlich hervorgeht. Die Bestrahlung erfolgte mit dem Zyklotron in Berkeley (Kalifornien). Deuteronen, Kerne des schweren Wasserstoffisotops mit dem Atomgewicht 2, wurden mit 16 Millionen V beschleunigt und erzeugten beim Auftreffen auf eine Berylliumschicht schnelle Neutronen. Die therapeutischen Ergebnisse sind nicht besser als bei der üblichen Röntgenbehandlung. Bei Neutronenbestrahlung treten ferner Spätschädigungen von einem Grade auf, wie sie bei Röntgentherapie bei gleich starken Führeraktionen nicht beobachtet wurden. In Parallelfällen werden bei Röntgentherapie nach Jahren leichte Atrophien der Haut festgestellt, während sich Muskelfibrose und Verlust des subkutanen Fettgewebes bei Neutronenbestrahlung einstellen. Die Regenerationsfähigkeit des Gewebes in der Umgebung des Tumors scheint durch Neutronen stärker beeinträchtigt zu werden als durch Röntgenstrahlen. Stone kommt auf Grund seiner Erfahrungen zu dem Schluß, daß die Resultate zu einer Fortsetzung der Neutronentherapie nicht ermutigen; ferner gibt er allen, die sich mit der medizinischen Anwendung neuer Strahlungen befassen, die Warnung, besonders auf die Spätschädigungen zu achten, die unter Umständen in unerwartetem Umfang auftreten können.

Protonenstrahlen wirken wie Elektronen- oder Röntgenstrahlen ionisierend auf die getroffenen Atome; die Ionendichte, d. h. die Zahl der pro Wegeinheit gebildeten Ionen, ist bei Protonen von gleicher Energie größer als bei Elektronen. Dies kann Unterschiede hinsichtlich der Primärwirkung auf die Zelle zur Folge haben. Wesentliche Verschiedenheiten der therapeutischen Wirkung beim Menschen sind aber kaum zu erwarten. Infolge der viel größeren Masse eines Protons ist dessen Eindringungstiefe im Gewebe erheblich kleiner als die eines Elektrons; sie beträgt bei 10 Millionen V Spannung etwa 1 mm für Protonen gegenüber 50 mm für Elektronen. Es würden daher sehr hohe Spannungen und umfangreiche technische Anlagen notwendig sein, um Protonen der benötigten Reichweite zu erzeugen. Dieser Aufwand erscheint nicht lohnend, da die Protonentherapie an sich keine besonderen Vorteile gegenüber der Röntgen- oder Elektronenstrahlentherapie verspricht.

Welche Aussichten bietet nun eine Tiefentherapie mit schnellen Elektronenstrahlen, wie sie durch die physikalisch-technischen Fortschritte nunmehr in den Bereich des Möglichen gerückt ist? Die durchdringungsfähigsten Elektronenstrahlen waren bis vor kurzem die $\beta$-Strahlen des Radiums und Mesothoriums. Ihre Reichweite erlaubte nur eine Behandlung oberflächlich gelegener Herde. Bei einer Abwägung der Vor- und Nachteile von zwei therapeutischen Strahlungen sind vor allem zwei Gesichtspunkte maßgebend:

1. Unterschiede in der spezifischen Wirkung auf die Zelle;
2. Unterschiede in der räumlichen Verteilung innerhalb des bestrahlten Körpers.

Zum ersten Punkt ist zu sagen, daß zytologische Befunde von Politzer und Pauli[1] an Salamanderlarven zunächst für eine spezifische Wirkung der Kathodenstrahlen zu sprechen schienen; eine Kernpyknose mit färbbaren Fäden in Richtung der Spindelachse war bei Röntgenbestrahlung niemals beobachtet worden. Bei Kathodenbestrahlung übersteigt aber die in der Sekunde applizierte Dosis die üblichen Röntgendosen um eine Größenordnung. Tatsächlich gelang es, mit einer Hochleistungsröhre, welche 500000 r in 12 Minuten zu verabreichen gestattete, an Axolotllarven dieselbe Form einer Mitosenschädigung auch mit Röntgenstrahlen hervorzurufen (H. und M. Langendorff[2]). Diese Feststellung, daß es keine spezifische biologische Wirkung der Elektronenstrahlen gibt, ist in bestem Einklang mit den obenerwähnten Vorstellungen vom Wirkungsmechanismus der Röntgen- und Elektronenstrahlen. Wie aus Wilsonschen Nebelkammeraufnahmen unmittelbar zu ersehen ist, erfolgt jede Wirkung der Röntgenstrahlen auf dem Umweg über die Auslösung von Elektronen aus dem absorbierenden Atom. Es kann daher keinen grundsätzlichen Unterschied im biologischen Effekt ausmachen, ob die Elektronen unmittelbar in Form eines Strahlenbündels — sei es in einer Kathodenstrahlenröhre oder als $\beta$-Strahlen eines radioaktiven Präparats — auf ein Atom treffen oder aber als sekundär aus röntgenbestrahlten Atomen ausgelöste Photo- und Compton-Elektronen. Es gibt auch keine spezifische Wirkung gewisser Röntgenwellenlängen auf bestimmte Stoffe im Gegensatz z. B. zur Erythemwirkung des Ultra-

[1] N. W. Timoféeff-Ressovsky und K. G. Zimmer, *Biophysik* Bd. 1 (Hirzel, Leipzig 1947).

[2] L. H. Gray, J. C. Mottram und J. Read, Brit. J. Radiol. *13*, 371 (1940).

[3] L. H. Gray, Brit. J. Radiol. *16*, 56 (1943).

[4] R. S. Stone, Amer. J. Röntgenol. *59*, 771 (1948).

[1] G. Politzer und W. E. Pauli, Strahlentherapie *33*, 704 (1929).

[2] H. Langendorff, Strahlentherapie *41*, 135 (1931).

violetts, die hauptsächlich auf den Wellenlängen 300 m$\mu$ und 150 m$\mu$ beruht (Hauser und Vahle[1]). Die Elektronen wirken einfach nach Maßgabe ihrer Energie, also ganz unspezifisch; je kürzer die Wellenlänge der Röntgenstrahlen ist, desto größer ist die Energie der ausgelösten Elektronen.

Es bleibt als wesentlich der zweite Punkt: die räumliche Ausbreitung der Strahlung. Über Tiefendosismessungen mit schnellen Elektronenstrahlen wurde erstmals 1934 auf dem internationalen Radiologenkongreß in Zürich berichtet und auf die grundsätzliche Bedeutung der Ergebnisse für die Entwicklung einer neuen Art von Tiefenbestrahlung hingewiesen (Glocker, Kugler Langendorff[2]). Eine Entladungsröhre von Brasch und Lange[3] wurde mit Gleichspannungsstößen von 1,6 Millionen V Spannung beschickt, die durch Aufsummierung der Entladungsspannungen von Kondensatoren in Marxscher Schaltung hergestellt wurden. Die Elektronen traten als nahezu paralleles Bündel durch ein dünnes Metallfenster aus. Um Elektronen von einheitlicher Geschwindigkeit zu erhalten, wurden durch einen unmittelbar außerhalb am Fenster angebrachten Magneten die langsamen Elektronen seitlich abgelenkt und so vom Objekt abgehalten. Der Abfall der Dosis mit der Tiefe ist sehr rasch, da die Reichweite der Elektronen in Wasser oder in Stoffen ähnlicher Zusammensetzung nur 6 mm beträgt. Eine Messung mit Ionisationskammern kam wegen deren zu großer Ausdehnung nicht in Betracht. Es mußte ein Verfahren gewählt werden, bei dem das Meßorgan möglichst klein ist und durch seine Anwesenheit die normale Strahlungsverteilung möglichst wenig stört. Diesen Bedingungen entspricht in besonders hohem Maße eine biologische Methode, die sich bei der Ausdosierung von Radiummoulagen als genau und zuverlässig bewährt hatte (Jüngling und Langendorff[4]). Sie beruht auf der Bestimmung der prozentualen Schädigungsziffer von Eiern der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), wobei als Schädigungsmerkmal das Nichtausschlüpfen der Larven diente. Bei Einhaltung bestimmter Bedingungen ist eine Konstanz der Strahlungsempfindlichkeit der Eier über lange Zeit hin gewährleistet. Die Empfindlichkeit der Eier ist in den ersten Stunden nach der Ablage wegen der raschen Reifung stark vom Alter abhängig (Langendorff und Sommermeyer[5]). Durch Darreichung von frischem Futter wurden die Fliegen zum Ablegen ihrer Eier veranlaßt. Drei Stunden nach der Ablage erfolgte die Bestrahlung. Dann wurden die Eier in einem Brutschrank bei der Temperatur von 25° C gehalten. Zur Messung wurden nur Eier mit einem Alter von 3 Stunden seit der Ablage herangezogen. Zu diesem Zweck wurden 18 Stunden nach der Bestrahlung die Eier zum erstenmal ausgezählt und die an ihrer fortgeschrittenen Entwicklung kenntlichen Eier mit mehr als 3 Stunden Alter, gerechnet zum Zeitpunkt der Bestrahlung, ausgeschieden. Nach weiteren 10 Stunden folgte die zweite Zählung. Aus der Zahl der ausgeschlüpften Larven und der Gesamtzahl der bestrahlten Eier einer Gruppe errechnet sich die prozentuale Schädigungsziffer. Zu jeder bestrahlten Serie wurde gleichzeitig eine Gruppe unbestrahlter Eier zur Bestimmung der Spontanschädigung in Höhe von 10 bis 15% angesetzt.

Um aus der Schädigungsziffer die Relativwerte der Dosis zu erhalten, ist anhand der Schädigungskurve (Abb. 1) eine Umrechnung vorzunehmen. Da die Form

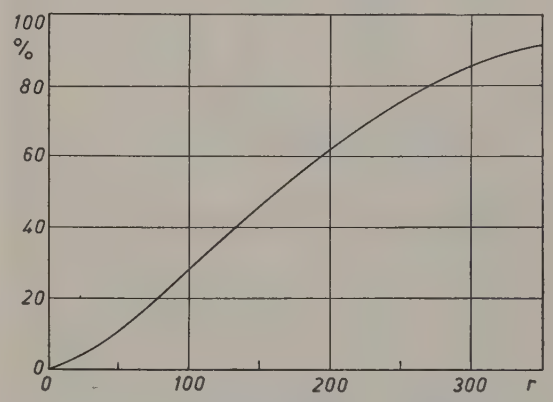



Abb. 1. Zusammenhang zwischen Schädigungsziffer und Dosis für *Drosophila*eier.

der Schädigungskurve bei Röntgenstrahlen und $\gamma$-Strahlen keine Abhängigkeit von der Wellenlänge zeigt (Packard[1], Jüngling und Langendorff[2]), so ist eine Übertragung auf Schädigungen durch Elektronenstrahlen sicher zulässig. Wie die Abb. 1 zeigt, ist die Schädigungsziffer keineswegs mit der Dosis proportional. Es ist daher zweckmäßig, die Bestrahlungszeiten so zu wählen, daß die Meßpunkte möglichst auf den mittleren, steilen Teil der Kurve zu liegen kommen.

Da die Ausbeute der Kathodenstrahlenapparatur, die nur behelfsmäßig aufgebaut war, sich von Stoß zu Stoß änderte, so mußten die Phantome so entworfen werden, daß sämtliche Punkte einer Tiefendosiskurve gleichzeitig aufgenommen werden konnten. Die Phantome bestanden aus einzelnen dünnen Platten von Pappelholz, Fiber, Aluminium und Messing, um die Ergebnisse bei Umrechnung nach dem Dichteverhältnis auf Wasser gegenseitig kontrollieren zu können. In der Mitte jeder Platte befand sich eine 0,3 mm tiefe Aussparung von 4 mm Durchmesser zur Auf-

[1] K. W. Hausser und W. Vahle, Wiss. Veröffentl. Siemens *6*, 101 (1927).

[2] R. Glocker, G. A. Kugler und H. Langendorff, Strahlentherapie *51*, 129 (1934).

[3] A. Brasch und F. Lange, Z. Phys. *70*, 10 (1931); Strahlentherapie *51*, 119 (1934).

[4] O. Jüngling und H. Langendorff, Strahlentherapie *48*, 174 (1933).

[5] H. Langendorff und K. Sommermeyer, Strahlentherapie *67*, 110 (1940) und 119; *68*, 42 und 656 (1940).

[1] Ch. Packard, J. Canc. Res. *10* (1926); *11* (1927).

[2] O. Jüngling und H. Langendorff, Strahlentherapie *48*, 174 (1933).

nahme von 80 bis 120 Eiern. Mit Hilfe einer gut passenden Führung durch 4 senkrechte Stifte wurden die $100 \times 100$ mm² großen Platten selbsttätig zentriert, so daß die Eier der verschiedenen Tiefen genau untereinander zu liegen kamen. Durch Flügelmuttern wurden die Platten fest aufeinandergepreßt, um stets gleiche Abstände einzuhalten. Jeder einzelne Versuch mit 10 Platten von einer Gesamtdicke, die 20 mm Wasser entsprach, umfaßte rund 1000 Eier.

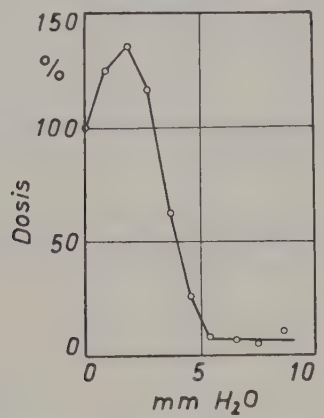



Abb. 2. Tiefendosisverlauf für Elektronenstrahlen von 1,6 Millionen Volt (nach Glocker, Kugler und Langendorff).

Als Beispiel ist der Verlauf der Tiefendosiskurven für das Fiberphantom in Abb. 2 wiedergegeben. Charakteristisch für alle untersuchten Stoffe ist das Auftreten eines ausgeprägten Maximums der Dosis in einer gewissen Tiefe. Dann folgt ein rascher Abfall bis auf einen kleinen, konstanten Rest, der hauptsächlich von sekundär gebildeten Röntgenstrahlen herrührt. Der Schnittpunkt der Verlängerung des steil abfallenden Astes der Kurve mit der horizontalen Achse liefert die Reichweite der Elektronen zu 5 bis 6 mm, auf Wasser umgerechnet. Die Höhe des Maximums beträgt je nach den Versuchsbedingungen 125 bis 150% der Oberflächendosis.

Diese Ergebnisse sind von grundsätzlicher Bedeutung. Das Idealziel der Tiefentherapie, mehr Strahlungsenergie in den tieferen Bezirken zur Absorption zu bringen als an der Oberfläche, wird von den erhaltenen Tiefendosiskurven nach Art der Abb. 2 erfüllt, während bei Röntgenstrahlen der üblichen Spannungen die Tiefendosis immer kleiner ist als die Oberflächendosis. Ein weiterer Vorteil ist die Schonung der hinter dem Herd gelegenen Körperpartien, weil die Dosis rasch nach Überschreiten des Maximums auf einen Wert, der praktisch Null ist, abfällt. Dieser Gesichtspunkt ist nicht minder wichtig, da sich in der Röntgentherapie immer mehr die Erkenntnis durchgesetzt hat, daß sich eine Durchstrahlung großer Volumenteile des Körpers für den Bestrahlungserfolg nachteilig auswirkt. Damit eröffnen sich für eine zukünftige Tiefenbestrahlung neue Möglichkeiten. Eine praktische Anwendung erfordert allerdings viel höhere Spannungen, als sie nach dem damaligen Stand der Technik verfügbar waren. Der geplante Bau einer Anlage mit 5 Millionen V mußte aus äußeren Gründen unterbleiben.

Die Ergebnisse der biologischen Tiefendosismessung wurden einige Jahre später durch Ionisationsmessungen an einem Aluminiumphantom im wesentlichen bestätigt (Trump, van de Graaff und Cloud[1]). Die Hochspannung von 1,5 Millionen V wurde von einem, nach Art einer Influenzmaschine gebauten van-de-Graaff-Generator geliefert. Das Maximum der Dosiskurve war infolge der relativ großen Tiefenausdehnung der Ionisationskammer verbreitert.

Zurückschauend muß man feststellen, daß die damals verwendeten Prinzipien der Hochspannungserzeugung eine Steigerung der Spannungen auf 20 bis 30 Millionen V, wie sie für eine praktische Tiefentherapie erforderlich sind, nicht ermöglicht hätten. Ein neuer Weg mußte gefunden werden: das «Betatron» (Kerst[2]) zur Beschleunigung von Elektronen beruht auf dem gleichen Grundgedanken wie das «Zyklotron» (Lawrence[3]) zur Erzeugung von Protonenstrahlen und künstlichen $\alpha$-Strahlen. Läßt man geladene Teilchen auf Kreisbahnen immer wieder ein relativ schwaches elektrisches Feld durchlaufen, so gewinnen sie bei jedem Umlauf einen kleinen Spannungszuwachs und kommen schließlich zu kinetischen Energien, die Spannungen von vielen Millionen V entsprechen, ohne daß es nötig ist, Hochspannungsfelder von solcher Größe direkt herzustellen. Die technische Durchführung dieses Prinzips ist, je nachdem es sich um leichte Teilchen (Elektronen) oder um schwere Teilchen (Protonen, Deuteronen, $\alpha$-Strahlen) handelt, verschieden.

Auf Grund von Arbeiten von Wideröe[4] und Steenbeck[5] entstand in Urbana (USA.) im Jahre 1940 das Betatron von Kerst[6], das zunächst für die Erzeugung ultraharter Röntgenstrahlen bestimmt war. Die Wirkungsweise dieses Apparats, der auch Induktionsbeschleuniger oder Strahlentransformator oder Elektronenschleuder genannt wird, läßt sich als ein Hochspannungstransformator beschreiben, dessen Sekundärspule durch ein evakuiertes Gefäß aus einem Isolationsstoff, z. B. Pyrexglas, ersetzt ist. Die Polschuhe $P$ eines sehr kräftigen Elektromagneten stehen senkrecht auf der Ebene des Entladungsgefäßes (Abb. 3). Werden nun mit Hilfe eines Glühdrahtes $G$ und eines Hilfsfeldes in kurzen Zeitintervallen Elektronen eingeschossen, so bewegen sich diese bei entsprechender Gestaltung des Magnetfeldes bei jedem Umlauf stets auf derselben Kreisbahn, unabhängig von

[1] I. G. Trump, R. I. van de Graaff und R. W. Cloud, Amer. J. Röntgenol. *43*, 728 (1940).
[2] D. W. Kerst, Phys. Rev. *60*, 47 (1941); *61*, 93 (1942); Radiology *40*, 115 (1943).
[3] E. O. Lawrence, Radiology *29*, 313 (1937).
[4] R. Wideröe, Arch. Elektrotechn. *21*, 387 (1928).
[5] M. Steenbeck, Naturwiss. *31*, 234 (1934).
[6] D. W. Kerst und L. S. Skaggs, Briefliche Mitteilung.

ihrer Geschwindigkeit. Haben die Elektronen bei einem Spannungszuwachs von z. B. 50 V pro Umlauf nach 300000 Umläufen die gewünschte Spannung von

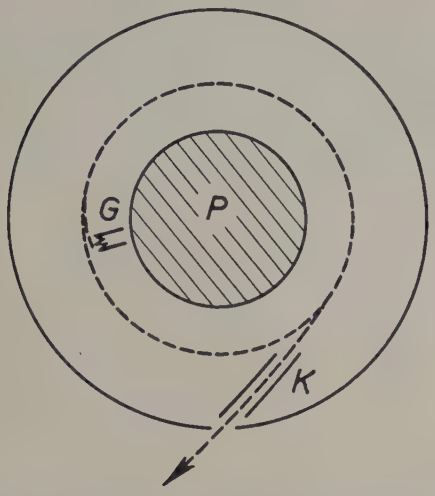



Abb. 3. Schematische Darstellung des Grundprinzips eines Betatrons (nach Kerst).

15 Millionen V erreicht, so wird automatisch eine Spule eingeschaltet, welche die Kraftlinienverteilung so abändert, daß sich die Elektronenbahnen spiralartig nach außen erweitern, auf eine an der Peripherie des Entladungsraums angebrachte Goldanode auftreffen und dort bei ihrer Abbremsung Röntgenstrahlen erzeugen. Innerhalb der kurzen Zeit von $^1/_{200}$ Sekunde wiederholt sich der Vorgang: Einschießen der Elektronen,

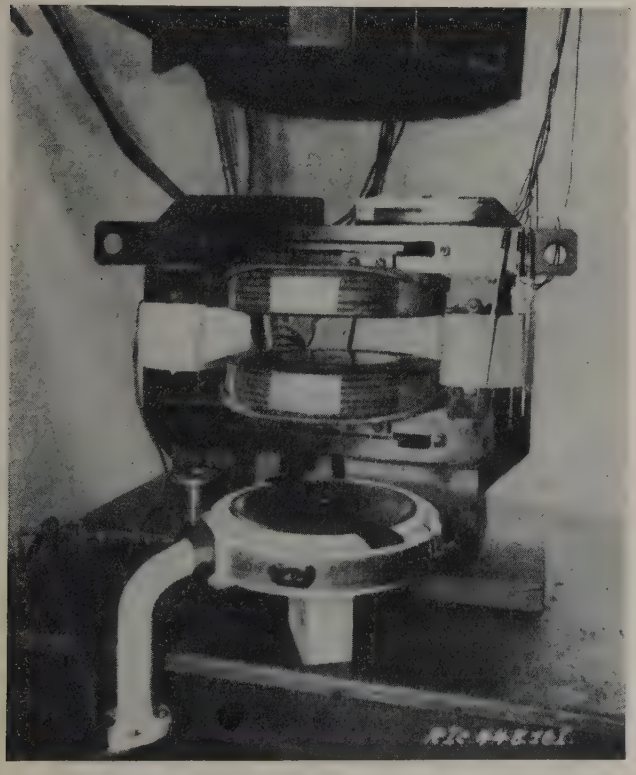


Abb. 4. Ansicht der Elektronenschleuder von Gund für 6 Millionen V.

Umläufe auf dem Gleichgewichtskreis, Expandieren der Bahn, Auftreffen auf die Anode.

Soll das Elektronenstrahlenbündel selbst austreten, so muß eine Einrichtung angebracht werden, welche die Elektronen von einem gewissen Bahnpunkt ab der Wirkung des Magnetfeldes entzieht, z. B. ein abschirmender Kanal (*K* in Abb. 3) aus Eisen (Skaggs, Almy, Kerst und Lanzl[1]) oder ein elektrostatisches Hilfsfeld in Verbindung mit der Aufspaltung des Bündels durch Streuung an einer Aluminiumfolie (Gund[2]).

Die wesentlichen Teile eines Betatrons sind aus der Abb. 4 zu ersehen, welche die Elektronenschleuder von Gund[3] für maximal 6 Millionen V darstellt. Zwischen den beiden Spulen wird das büchsenförmige, aus einer keramischen Masse verfertigte Entladungsgefäß eingesetzt. Der Durchmesser der Elektronenbahn beträgt 16 cm; ein Elektron legt einen Weg von rund 100 km zurück, bis es die Spannung von 6 Millionen V erreicht. Betatrone für 100 Millionen V, wie sie in USA. gebaut wurden, erfordern ungeheure Eisenmengen, da die Stärke des erforderlichen Magnetfeldes mit Steigerung der Spannung mehr als proportional zunimmt. Doch ist es neuerdings gelungen, durch Verwendung des sogenannten «Synchrotronprinzips» (McMillan[4]) wesentliche Ersparnisse an Eisen zu erzielen.

Ionisationsmessungen an Elektronenstrahlen von einigen Millionen V Spannung lieferten in gewissen Tiefen einen Höchstwert der Dosis (Abb. 5), der mit

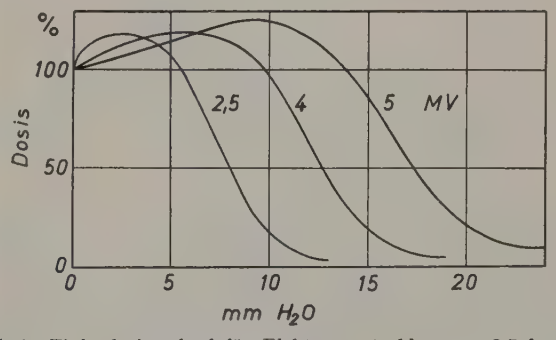



Abb. 5. Tiefendosisverlauf für Elektronenstrahlen von 2,5 bzw. 4 bzw. 5 Millionen V nach Ionisationsmessungen von Gund und Wachsmann.

steigender Spannung zunimmt (Gund und Wachsmann[5]). Bei einer biologischen Bestimmung der Tiefendosiskurve für 5 Millionen V (Abb. 6) tritt das Maximum noch deutlicher hervor; es ist bis zu 50% größer als der Oberflächenwert (Glocker, Gund Langendorff und Wachsmann[6]). Die im Verhältnis zu den sehr kleinen *Drosophila*eiern große Ionisationskammer wirkt auf den Kurvenverlauf ausglättend. Die

[1] L. S. Skaggs, G. M. Almy, D. W. Kerst und L. H. Lanzl, Phys. Rev. *70*, 95 (1946).
[2] K. Gund, *Naturwissenschaft*, 343 (1947).
[3] K. Gund, Nachr. Akad. Wiss. Göttingen 9 (1946).
[4] E. M. McMillan, Phys. Rev. *68*, 163 (1945).
[5] K. Gund und F. Wachsmann, Strahlentherapie, im Druck.
[6] R. Glocker, K. Gund, H. Langendorff und F. Wachsmann, Strahlentherapie *78*, 321 (1949).

Tiefenlage des Maximums, bezogen auf die gesamte Eindringtiefe, ergibt sich bei beiden Meßverfahren als praktisch gleich. Die Kreispunkte der Abb. 6 wurden mit einem Trolitulphantom aus Scheiben mit 120 mm Durchmesser aufgenommen. Trolitul ist ein organischer Kunststoff, der nahezu die Dichte 1 hat und ähnliche chemische Zusammensetzung besitzt wie das Gewebe. Bei einer Elektronenreichweite von 20 mm war somit das Bestrahlungsfeld wesentlich größer als die Reichweite. Zur Darstellung des umgekehrten Verhältnisses wurde ein Phantom aus dünnen Aluminiumplatten von nur 12 mm Scheibendurchmesser hergestellt und bei der Bestrahlung an einem Cellophanband frei in Luft aufgehängt. Nach Umrechnung auf Wasser ergibt sich eine ähnliche Dosisverteilung; das Maximum ist etwas niederer als zuvor (125% des Oberflächenwertes). In gleicher Weise wirkt eine Einengung des Feldes beim großen Phantom durch Blenden. Wird nun das Strahlenbündel durch eine 5 cm vor dem kleinen Phantom angebrachte Streufolie aus 0,5 mm

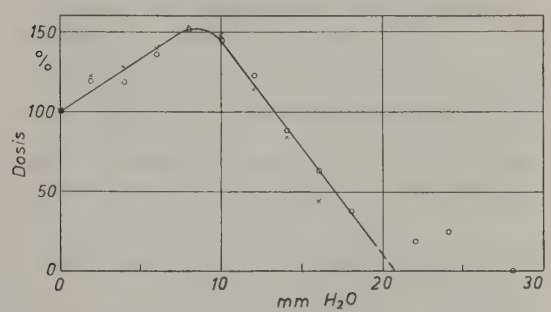



Abb. 6. Tiefendosisverlauf für Elektronenstrahlen von 5 Millionen V nach biologischen Messungen von Glocker, Gund, Langendorff und Wachsmann.

dickem Aluminium divergenter gemacht, so wird eine Dosiskurve erhalten (in Abb. 6), die mit der des großen Phantoms (ohne Ausblendung) praktisch übereinstimmt; die Überhöhung beträgt rund 150% der Oberflächendosis. Daraus geht hervor, daß der Absolutwert der maximalen Dosis von den speziellen Versuchsbedingungen abhängig ist. Der Vergleich der Abb. 2 mit der Abb. 6 zeigt, daß die früher bei 1,6 Millionen V beobachtete typische Form der Abnahme der Dosis mit der Tiefe auch bei 5 Millionen V vorhanden ist.

Um gewisse Unterlagen dafür zu gewinnen, wie die Verhältnisse sich bei den viel höheren, praktisch in Betracht kommenden Spannungen wohl gestalten werden, wurde im Anschluß an die ersten Versuche mit 1,6 Millionen V die Frage nach der Entstehung des Maximums der Tiefendosis theoretisch untersucht (Glocker[1]). Beim Durchgang eines parallelen Strahlenbündels durch materielle Schichten spielen zwei Vorgänge eine Rolle:

1. die Abnahme der Energie des einzelnen Elektrons auf seiner Bahn;
2. die Abnahme der Zahl der Elektronen des Bündels durch Ablenkung infolge von Streuprozessen.

Es ist bekannt, daß ein schnelles Elektron beim Zusammentreffen mit einem Atom einen Teil seiner kinetischen Energie an dieses abgibt; am Ende seiner Bahn ist dieser Energieverlust $\Delta E$, bezogen auf 1 mm

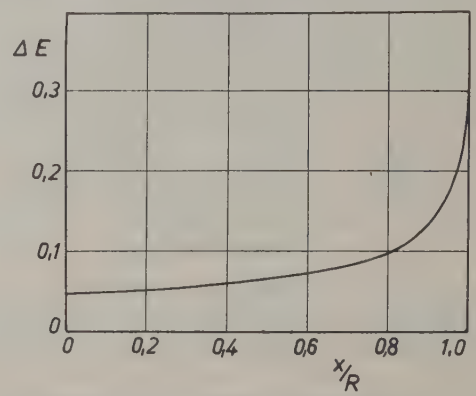



Abb. 7. Energieabgabe (pro Wegeinheit) eines Elektrons auf seiner Bahn (Whiddingtonsches Gesetz).

Wegstrecke, ganz besonders groß (Abb. 7). Man sollte daher von vorneherein erwarten, daß das Maximum der Tiefendosis am Ende der Bahn auftritt. Diese z. B. kürzlich wieder von Compton[1] ausgesprochene Ansicht wird durch die Versuchsergebnisse nicht bestätigt. Neben der Bremsung ist noch die Streuung zu berücksichtigen; in vielen Fällen ist der Zusammenstoß zwischen Elektronen und Atomen elastisch; es erfolgt nur eine Richtungsänderung der Bahn des Elektrons. Auf diese Weise wird ein Teil der Elektronen aus dem

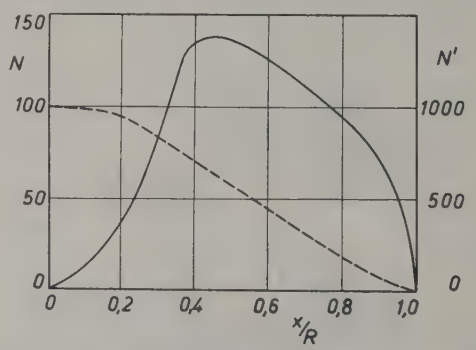



Abb. 8. Abnahme der Zahl der Elektronen eines parallelen Bündels beim Durchgang durch Aluminium (umgezeichnet nach Schonland). (Der Maßstab für $N$ und $N'$ ist verschieden).

ursprünglichen Bündel weg nach allen Richtungen hin abgelenkt. Zur Veranschaulichung der Abnahme der Teilchenzahl können Messungen von Schonland[2] dienen, die allerdings bei relativ niederen Spannungen (90000 V) ausgeführt wurden. Die Zahl $N$ der hinter

[1] R. Glocker, Phys. Z. *35*, 774 (1934).

[1] K. T. Compton, J. Amer. Med. Ass. *131*, 77 (1946).

[2] B. F. Schonland, Proc. Roy. Soc. A *104*, 235 (1923); *108* 187 (1925).

Aluminiumfolien von wachsender Dicke noch vorhandenen Elektronen ist durch die gestrichelte Kurve dargestellt (Abb. 8); sie nimmt zuerst langsam, dann nahezu proportional mit der Schichtdicke ab, die in Bruchteilen der praktischen Reichweite[1] eines Elektrons angegeben ist. Von besonderem Interesse ist nun die Zahl $N'$ der Elektronen, die in jeder einzelnen Schicht steckenbleiben (ausgezogene Kurve der Abb. 8). Diese, in der betreffenden Schicht völlig abgebremsten Elektronen können Elektronen des Bündels sein, die durch die Vorderseite der Schicht eintreten, oder aber solche, die durch seitliche oder rückwärtige Streuung in diese Schicht gelangen. Maßgebend für die Ionisation oder die biologische Wirkung in einer Tiefenschicht ist die gesamte dort erfolgte Energieabgabe, also das Produkt aus der Zahl der in der Schicht steckenbleibenden Elektronen $N'$ und der mittleren Energieabgabe $\Delta E$ eines Elektrons. Bis zu $^3/_4$ der Reichweite ändert sich $\Delta E$ nur allmählich, so daß für den qualitativen Verlauf der in einer Schicht deponierten Energie die Kurve für $N'$ ausschlaggebend ist. Diese hat ein ausgeprägtes Maximum bei der 0,4fachen Reichweite. Wie die Berechnung im einzelnen zeigte, ist das Maximum der Tiefendosis bei Elektronenstrahlen von 1,6 Millionen V bei etwa einem Drittel der Reichweite zu erwarten. Es muß jedenfalls in der ersten Hälfte der Reichweite und nicht am Ende der Bahn liegen, was durch die Meßergebnisse der Abb. 2, 5, 6 auf das beste bestätigt wird.

*Tabelle I*

| Spannung in Millionen V | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| Größe des Dosismaximums in Prozenten der Oberflächendosis . . . | 125 | 140 | 160 | 185 | 210% |
| Tiefenlage des Dosismaximums, ausgedrückt in Bruchteilen der Reichweite . . . . . | 0,28 | 0,31 | 0,31 | 0,30 | 0,30 |

Mit einer ganz anderen Meßmethode, nämlich durch photometrische Bestimmung der Verfärbung von KCl-Kristallen unter Elektronenbestrahlung, wurden kürzlich aufschlußreiche Ergebnisse hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit des Dosismaximums erhalten (Paul und Berger[2]). Daraus geht hervor, daß im KCl-Kristall der Absolutwert der maximalen Dosis bei Erhöhung der Spannung von 2 auf 6 Millionen V erheblich zunimmt, während sich die Tiefenlage mit rund einem Drittel der Reichweite nicht ändert. Durch Verwendung sehr feiner Bündel konnte die «flaschenförmige» Ausbreitung des Bündels durch Streuung im einzelnen verfolgt werden.

Den ersten Vorstoß in das Spannungsgebiet, das für eine Tiefentherapie praktisch in Betracht kommt, brachten Ionisationsmessungen von Kerst und Skaggs[1] bei 16,5 Millionen V. Das am Fenster des Betatrons noch sehr enge Strahlenbündel erweitert sich allmählich durch Streuung in der Luft auf einen Querschnitt von $2\times4$ cm² in 40 cm Abstand. Um eine gleichmäßige Bestrahlung eines Hautfeldes[2] von $10\times10$ cm² zu erreichen, wurde am Fenster ein aus Kohlenwasserstoffen bestehender Streukörper angebracht. Aus dem durch Streuung so verbreiterten Bündel wird durch eine Blende die Nutzstrahlung herausgeschnitten. Der Raum zwischen dem Streukörper und der Austrittsblende ist evakuiert. Den Dosisverlauf bei 60 cm Abstand vom Fenster zeigt die Abb. 9. Die Dosis

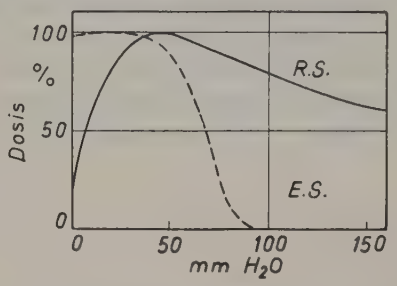



Abb. 9. Tiefendosisverlauf für Röntgenstrahlen von 20 Millionen V bzw. Elektronenstrahlen von 16,5 Millionen V nach Ionisationsmessungen von Kerst und Skaggs.

bleibt in den ersten 4 cm Wasser praktisch konstant, um dann in der früher beobachteten Weise rasch auf den Wert 0 in 9 cm Tiefe abzufallen. Bei orientierenden Messungen ohne Streukörper und Blende wurde in 3 cm Tiefe, also in etwa einem Drittel der Reichweite, ein Maximalwert der Dosis mit 114% erhalten. In großen Zügen ist somit bei 16 Millionen V das Bild der Dosisverteilung das gleiche wie bei 5 Millionen V.

Von ganz besonderem Interesse ist der Vergleich der Tiefendosiskurven von schnellen Elektronen und von ultraharten Röntgenstrahlen; hat doch das Betatron auch für die Röntgentherapie neue, nicht vorherzusehende Verhältnisse gebracht. Bei Röntgenstrahlen von 20 Millionen V ist die Halbwertschicht in Wasser für die kürzeste vorkommende Wellenlänge etwa 40 cm. Die Schwächung spielt praktisch keine Rolle für die Abnahme der Dosis mit der Tiefe. Diese ist in erster Linie durch das Gesetz von der Abnahme der Intensität mit dem Quadrat der Entfernung von der Strahlenquelle bedingt. Nun ist aber bei 20 Millionen V der Gang der Dosis mit der Tiefe (ausgezogene Kurve in Abb. 9) ein ganz anderer als bei den üblichen Spannungen der Röntgentherapie, wie Ionisationsmessungen in 45 cm Fokusabstand mit einem Feld von $7\times7$ cm² zeigen (Koch, Kerst und Morrison[2]). In

[1] Projektion der Bahnlänge in der ursprünglichen Richtung des Strahls.

[2] W. Paul und H. Berger, Z. Naturforsch, im Druck.

[1] D. W. Kerst nnd S. Skaggs, freundliche briefliche Mitteilung.

[2] H. W. Koch, D. W. Kerst und P. Morrison, Radiology *40*, 120 (1943).

3 cm Tiefe ist die Dosis 3mal so groß als an der Oberfläche. Dieser überraschende Befund ist durch den Umstand bedingt, daß bei sehr hohen Spannungen die aus den bestrahlten Atomen ausgelösten Compton-Elektronen fast alle in Richtung der einfallenden Röntgenstrahlen emittiert werden. Von der Luft her fallen weniger Compton-Elektronen auf die Oberfläche, so daß hier die Dosis die geringste Erhöhung durch diesen Beitrag erfährt. Die Entfernung des Dosismaximums von der Oberfläche entspricht der durchschnittlichen Reichweite der Compton-Elektronen und vergrößert sich demgemäß mit wachsender Spannung.

Eine Tiefentherapie mit ultraharten Röntgenstrahlen ermöglicht es also ebenfalls, an den Herd eine Dosis zu bringen, die größer ist als an irgendeinem anderen Ort des durchstrahlten Körpers. Wegen des langsamen Abfalls der Dosis hinter dem Herd – bei einem Körper von 20 cm Dicke ist die Austrittsdosis noch die Hälfte des Höchstwertes – wird aber eine sehr hohe Volumendosis erreicht, was aus den früher erwähnten Gründen durchaus unerwünscht ist.

Bei Bestrahlung mit schnellen Elektronen werden die gesunden Körperpartien wegen der begrenzten Eindringungstiefe zweifellos mehr geschont. Als weitere Vorteile sind die viel größere Intensität zu nennen, die sehr kurze Behandlungszeiten ermöglicht, sowie die Vereinfachung des Strahlenschutzes. Man wird daher der weiteren technischen Entwicklung im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung der schnellen Elektronenstrahlen mit gespannter Erwartung entgegensehen.

*Summary*

It is discussed which of the new rays of atomic physics (protons, neutrons, electrons) may be applicable for depth therapy. The range of protons is too short. Recent information from the U.S.A. shows that neutron therapy is not as successful as formerly supposed. Irradiation with fast electrons produced by the betatron may be superior to X-ray therapy. Some preliminary results of biological experiments with *Drosophila* eggs and ionization measurements are reported. The position of the maximum effect is some centimetres below the surface and not on it. Electrons have a definite range, so that the parts of the body beyond this range are not irradiated.

# New Pathways of the Physiology of Infection and Immunity

By G. Mansfeld[1], Budapest

## I. *The role of the nervous system in the genesis of infectious diseases*

H. Bergson says that to understand you have to put yourself into the position of the one you try to understand. Trying to understand the genesis of an infectious disease, we do well to think ourselves into the position of the pathogenic germ that entered the organism and ask what we should do in its place. It is quite clear that the first and paramount task of such a primitive creature is to procure food. The way these protophytes get their food has been known since we learned to cultivate them. They split the ingredients of the media with their enzymes and feed upon these breakdown products. They have to procure their food in the same way in the living organism, with the difference that here they find not dead matter ready for them, as in the culture media, but living cells. Thus the first question arising is:—What happens to living cells when brought into contact with enzymes?

The literature is rather laconic on this problem, and I myself can say more about this only because, in my very young days, when the problem of life and death fascinated me, I wondered whether a well-defined difference between live and dead cells could be established. I performed an experiment that made a great impression on me and—maybe subconsciously—inspired me decades later to make a series of experiments on which I have been working now since 14 years, and the results of which I should like to report now for the first time.

If we prepare an emulsion of unicellular organisms, for instance bacteria (I used *Paratyphus* B), and subject them to the action of an enzyme that splits all their ingredients, proteins, fats, and carbohydrates—as does pancreatic juice—nothing happens at all, not even if we keep the mixture for hours in the thermostat. If, however, the cells have been heated previously to 60°C or treated with 1–2% carbolic acid, the same enzyme digests the cells in about half an hour and the opaque emulsion becomes transparent.

Analogously we have to suppose that the enzymes of bacteria can attack only cells which are, if not dead, at least damaged. The so-called pathogenic germs are ambitious and not content to live on predigested food like the saprophytes of the intestine; so they produce toxins to damage the cells of the organism. Once these toxins are neutralized, as seen in diphtheria, the germs become powerless and mostly leave the organism, looking for another, more suitable "climate".

[1] Institute of Physiology, University of Budapest.

There are not many cases known in which detoxication of a toxin cures a disease, but the example of diphtheria is really exemplary, and I think that, when analysing the genesis of infections, we have to consider the problem of the toxins, that is their fate in the organism, more thoroughly than heretofore.

If we now examine the fate and the mode of action of these toxins not only from the standpoint of the bacteriologist, but also from that of the physiologist, then first of all we find that we have to do with substances of which infinitesimally small quantities have relatively very great effects, and that these effects are not produced immediately but after a certain latency. The significance of the fact that the great effect of small quantities and the latency are closely related to one another was bound to escape the attention of bacteriologists and also of physiologists until we found a well-defined crystalloid substance that exerts its effect after a period of latency in toxin-like small quantities. This substance is a hormone of the thyroid: *thyroxine*. It was first found by GUNNAR AHLGREN[1] that this hormone greatly increases oxidation in the cells, when administered in a concentration of $10^{-12}$, that is one millionth of a microgram p. cc (i. e. thousand million molecules of thyroxine). After 2–3 years of incredibly hard work the knowledge of the specific qualities of thyroxine provided a deeper insight into the workshop of the organisms. Omitting details, this can be summarized as follows:—

First, it became clear that thyroxine, which was supposed to be a substance stimulating oxidation, does not act on combustions proceeding on the surface of the cells, but influences fermentative processes in the oxygen-poor interior of the cells, and thus only secondarily speeds up combustions[2].

Another fact revealed was that those exceedingly small quantities of thyroxine normally found to be active on the cells cannot exert their influence via the cell surface, where oxidations are in full vigour. That means that they cannot reach the cells from the blood but must get into the interior of the cells through a backdoor to become effective. This backdoor is the nerve fibre which connects every cell of the organism with the central nervous system[3].

That the axon conducting impulses can conduct chemical substances as well, was first shown for tetanus toxin by MEYER and RANSON[4], and has since then been demonstrated for several viruses also. Thus the supposition that thyroxine takes the same route to reach the interior of the cell did not seem impossible. The hypothesis was supported by an interesting finding of SCHITTENHELM and EISLER[5] according to which the iodine content of the brain of rabbits (especially that of the tuber cinereum) sharply increases after the intravenous injection of thyroxine. But another experiment shows even more clearly that thyroxine wanders along the nerves and reaches the cells in this way:—if we want to examine the distribution of thyroxine in the body and its mode of action, we take an organ (for instance a kidney) or fragments of an organ and determine its $O_2$-consumption. Repeating the procedure a certain time after the administration of thyroxine on the other kidney or on fresh fragments, we can determine the rate of increase of $O_2$-consumption. If we now compare the minimum time required for the appearance of the thyroxine effect in different organs, we see that this depends upon the distance that separates the particular organ from the central nervous system[1]. This finding excludes the possibility that thyroxine reaches the peripheral cells via the blood-stream, because its effect would then become apparent everywhere simultaneously, and can be explained only by assuming that thyroxine reaches the cells through the nerve fibres.

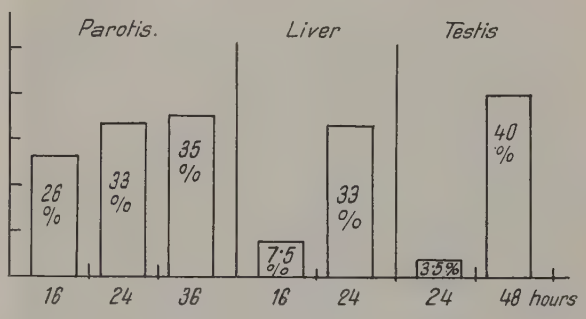



Fig. 1. – Increase of $O_2$-consumption in %.

It can be seen that while the thyroxine effect develops in the parotid after 16 hours, no effect is observed at that time in the liver. After 24 hours $O_2$-consumption of the liver is found to be increased, while the testicles, being further away from the brain, show an increase only 48 hours after the injection.

These experiments not only proved this peculiar wandering of thyroxine but also explained the long latent period of its action, a phenomenon similar to that called incubation in the case of infectious diseases. *This gave me the idea that the toxins of bacteria might have to travel the same way to be able to damage the cells effectively.*

We had first to test the supposition that toxins and viruses reach certain cells of organs by way of the nerves as thyroxine does, the different affinities of the nerve-cells to the different toxins and viruses thereby determining the localization of the disease. One fact which supports this possibility *a priori* is that infectious diseases are accompanied by fever which is known

[1] GUNNAR AHLGREN, Skand. Arch. Physiol. *47*, Suppl. 225 (1925).
[2] G. MANSFELD, Klin. Wschr. *14*, 884 (1935).
[3] G. MANSFELD and G. HORVÁTH, Pflügers Arch. *235*, 520 (1935).
[4] H. MEYER and FRED RANSOM, Arch. exp. Path. Pharm. *49*, 369 (1903).
[5] A. SCHITTENHELM and B. EISLER, Klin. Wschr. *6*, 1935 (1927).

[1] G. MANSFELD, Arch. exp. Path. Pharm. *193*, 241 (1939).

to be due to the toxins and viruses penetrating and stimulating certain cells of the brain. For the experimental tests of our working hypothesis, we chose the following method:— It is well known, that there are some drugs which can cure colds or other infectious diseases like polyarthritis, or may prevent them if given in proper time. These drugs are the salicylates or more generally the antipyretics, which act in the mid-brain on the heat-centres. It should be remembered that alcohol with its great affinity to nervous centres—and among these the heat-centres—is of great therapeutic value in case of some infections, puerperal fever for instance. Pharmacologists know that these drugs, if they have any bactericidal properties, display them only in concentrations that can never be attained inside the organism. But they are also acquainted with the type of drug-antagonism known as *displacement* (*Verdrängung*) that means that one drug expells another from the cell, or, when given in time, prevents the other one getting inside the cell. Thus it was no wonder that I first tried to prove my hypothesis this way.

At that time the latest news in medicine was the discovery of the action of sulfonamides (SA), and there arose a lively discussion whether these compounds are true chemotherapeutics, killing the bacteria themselves, or whether they cure in some other mysterious way called usually "increasing the resistance of the organism"? That the action of the SA is not directly bactericidal was clear to everyone versed in natural sciences, since the concentrations in which they have to be applied locally or *in vitro* to kill bacteria are about 8,000 times their curative concentration in the human organism. Levaditi[1] was the first to suggest, that the action of the SA is directed *against the toxins* and not against the bacteria, and considering what was said above, we had to think *that the SA, being neurotropic substances themselves, enter the brain-cells and by blocking them exclude the toxins*. To begin with, I tested the correctness of my hypothesis in a model experiment, which proved decisive for the further work. If the SA can really block the brain-cells for other substances, then, administered in time and permanently, they should be able to prevent the effect of thyroxine, but should not influence the already developed thyroxine effect, as this takes place on the periphery after the thyroxine has arrived there along the nerves.

The following experiments confirmed this assumption in every point, but besides this they revealed another very interesting fact. It is known that different SA are not equally effective in different diseases, one being more effective against erysipelas, the other against pneumonia, the third against gonorrhœa. Examining the action of thyroxine on the liver, under the influence of different SA:— sulfapyridine (SPYR) proved to be ineffective, while paraaminobenzosulfamide (PBSA) completely inhibited the increase of $O_2$-consumption following thyroxine. I can only explain thie by assuming that while PBSA blocks the brain-cells through which thyroxine reaches the liver, SPYR leaves these cells unaffected, a fact that throws an interesting light on the problem of the specificity of these drugs.

*Table I*

$O_2$-consumption of liver-cells increased by thyroxine, in %

| Without SA | Treated before thyroxine with | | Treated 24 hours after thyroxine with PBSA |
|---|---|---|---|
| | SPYR | PBSA | |
| + 30 | + 24 | + 7 | + 36 |
| + 39 | + 9 | + 12 | + 32 |
| + 24 | + 37 | — 14 | + 34 |
| + 21 | + 13 | — 19 | Average |
| + 42 | + 79 | + 9 | + 34% |
| + 39 | + 33 | + 2 | |
| + 24 | + 24 | Average | |
| + 31 | + 40 | — 3% | |
| + 19 | Average | | |
| + 14 | + 32% | | |
| + 35 | | | |
| + 26 | | | |
| + 27 | | | |
| + 23 | | | |
| Average | | | |
| + 27% | | | |

Table I shows the effect of 1 mg thyroxine on $O_2$-consumption of liver-cells (rabbit) and the change of this effect caused by administering SA. The dose of SA was given first 4 hours *before* the administration of thyroxine and continued every 4 hours, day and night. Continuous administration is essential for obtaining positive results. This observation corresponds with clinical experience that only maintainance of a certain blood level secures satisfactory therapeutic results. The last column of the table shows that if we begin the administration of SA 24 hours *after* the injection of thyroxine, but otherwise just as in the other experiments, the action of thyroxine is not affected:— an unassailable proof that a simple destruction of the thyroxine effect is out of question.

Another interesting case of the specificity of SA was also found. As we saw, the thyroxine effect in the liver could only be prevented by the use of PBSA. SPYR, proved to be ineffective. It could be assumed that SPYR is altogether ineffective in preventing the development of the thyroxine effect. If, however, we repeat these experiments with the parotid and the testicles, we find the same SPYR that proved to be ineffective in the case of the liver, inhibiting completely any increase of $O_2$-consumption in the parotid and testicle cells—a very strong proof in favour of my theory that the specificity of the SA is due to a selective affinity of the different compounds towards different cell-groups of the brain, as is the case with bacterial toxins.

[1] C. Levaditi and A Vaisman, Presse médicale *45*, 1371 (1937).

*Table II*

Increase of $O_2$-consumption of liver, parotid, and testicle cells following administration of thyroxine after previous treatment with SPYR.

| Liver | | Parotis | | Testis | |
|---|---|---|---|---|---|
| normal | SPYR | normal | SPYR | normal | SPYR |
| + 30 | + 24 | + 105 | + 13 | + 13 | + 18 |
| + 39 | + 9 | + 34 | — 9 | + 10 | — 20 |
| + 24 | + 37 | + 28 | + 16 | + 18 | + 5 |
| + 21 | + 13 | + 73 | + 8 | + 9 | — 22 |
| + 42 | + 79 | + 15 | — 7 | + 12 | — 19 |
| + 39 | + 33 | + 24 | + 28 | + 10 | + 17 |
| + 24 | + 24 | + 16 | + 6 | + 21 | + 6 |
| + 31 | + 40 | Average | — 4 | + 14 | + 8 |
| + 19 | Average | + 42% | — 5 | + 15 | — 17 |
| + 35 | + 32% | | Average | Average | — 14 |
| + 26 | | | + 4·4% | + 13% | — 15 |
| + 23 | | | | | Average |
| + 27 | | | | | — 5% |
| Average | | | | | |
| + 27% | | | | | |

Similar experiments with antipyretics also gave very interesting results. 0·5 g of antipyrine, which inhibits or abolishes the rise of body temperature following puncture of the thermoregulatory centre of the brain (*Wärmestich*), proved to be completely ineffective on the liver effect of thyroxine. But the most interesting fact was that this effect could be prevented by microdoses of quinine—0·5 mg every four hours in rabbits—while doses of 0·10 g were ineffective, a fact which is the more interesting as it is universally known that only these microdoses have a preventive effect in the case of human influenza, for instance.

*Table III*

Increase of $O_2$-consumption of liver-cells following thyroxine administration, in %

| Without previous treatment | Treated with | | |
|---|---|---|---|
| | 0·10 g quinine | 0·0005g quinine | 0·5 g antipyrine |
| + 16 | + 62 | + 8 | + 33 |
| + 25 | + 36 | + 9 | + 123 |
| + 25 | + 28 | + 8 | + 35 |
| + 29 | + 32 | + 5 | + 29 |
| + 35 | Average | + 9 | Average |
| + 66 | + 39% | — 16 | + 55% |
| Average | | Average | |
| + 33% | | + 3% | |

After these promising preliminaries we turned to the main-experiments to see whether we could inhibit or prevent the effect of *bacterial toxins* by SA. In these experiments filtrates of bouillon cultures were used which had been concentrated to $^1/_{10}$ of their original volume *in vacuo*. 2–3 cc of this preparation produced marked fever in rabbits. A combination containing 0·20 g of each of the three principal representatives of the SA:—PBSA, SPYR, and sulfathiazole, were administered to rabbits simultaneously with, or following an interval after the injection of toxins, and the effect on body temperature was observed.

Before I report on these experiments two problems have to be cleared up. First:—may not the SA paralyse the heat-centres directly and thus exhibit an antipyretic action like the antipyretics; secondly:—do the SA not bind the toxins chemically—that is *in vitro*—and thus inhibit their action without any blocking of the brain-cells.

The first problem was approached by investigating the effect of SA on fever caused by puncture of the thermoregulation centre. The following experiments show the results; it is obvious that the SA cannot influence the excitation of the heat-centre even in the massive doses mentioned (0·60 g).

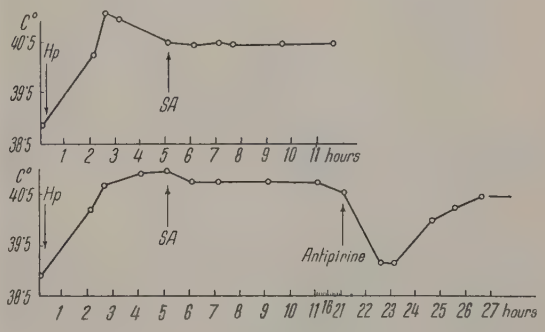



Fig. 2. – Puncture of the heat-puncture centre *Hp*.

Experiments aiming at detoxication of the toxins were also unsuccessful. In these we mixed the toxins with quantities of SA that we knew were too small to have any effect on the organism and kept the mixtures for 2–3 and sometimes up to 40 hours in the thermostat before injection. The results may be seen on the following charts.

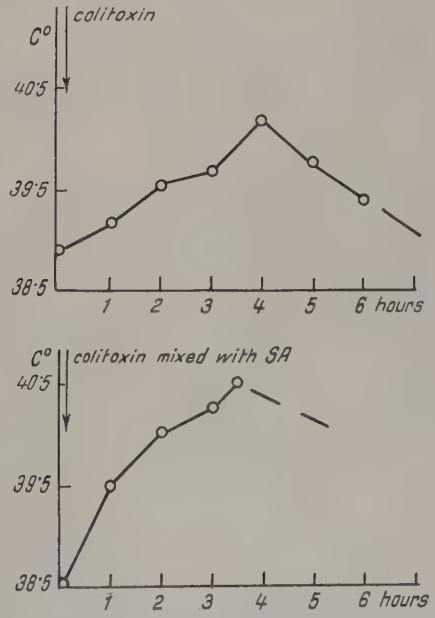



Fig. 3. – Effect of *in vitro* "detoxication" of colitoxin by SA. SA has no effect on pneumotoxin *in vitro*.

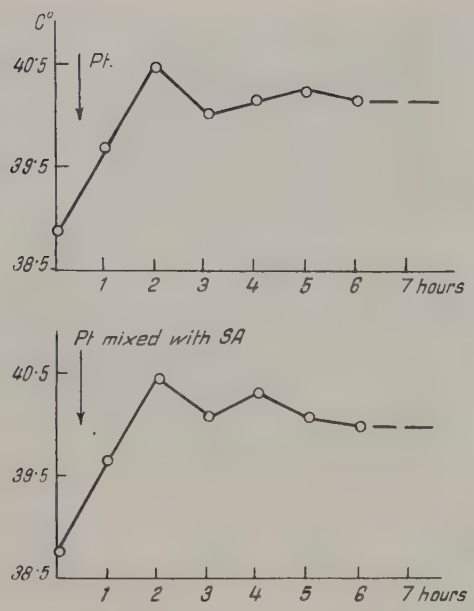



Fig. 4. Effect of *in vitro* "detoxication" of pneumococcus toxin (*Pt*) by SA.

The main-experiments were performed with 6 different toxins, obtained from coli, dysenteria, typhoid, streptococcus, staphylococcus, and pneumococcus strains. The SA proved to be effective against the colli streptococcus, and pneumococcus toxins, while they had no effect on staphylococcus, typhoid, and Shiga-Kruse toxins, a finding that corresponds with clinical

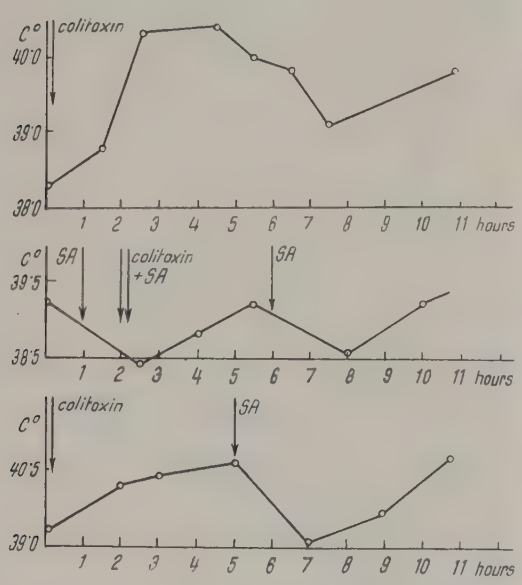



Fig. 5. Colitoxin

experience (Figs. 5—11). The SA were also totally ineffective in the case of tetanus and diphtheria toxins.

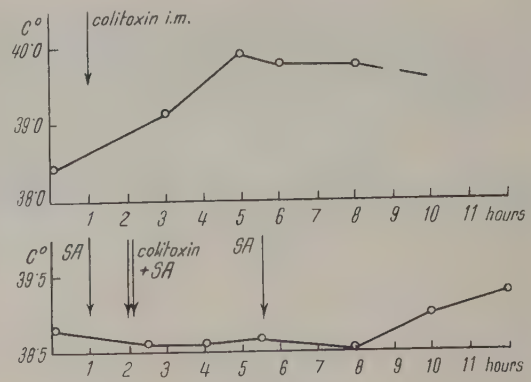



Fig. 6. Colitoxin

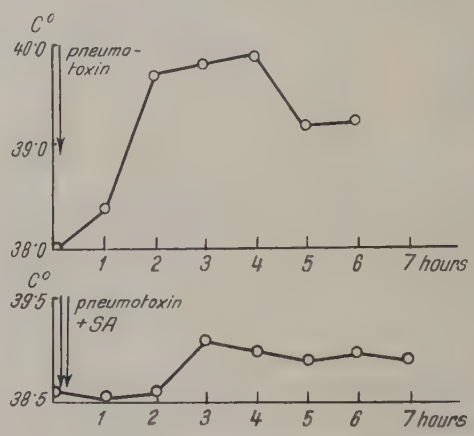



Fig. 7. Pneumococcustoxin

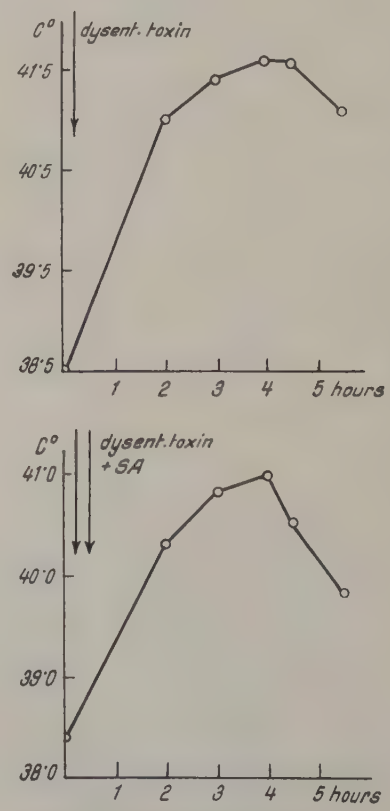



Fig. 11. Dysenteria (Shiga-Kruse) toxin

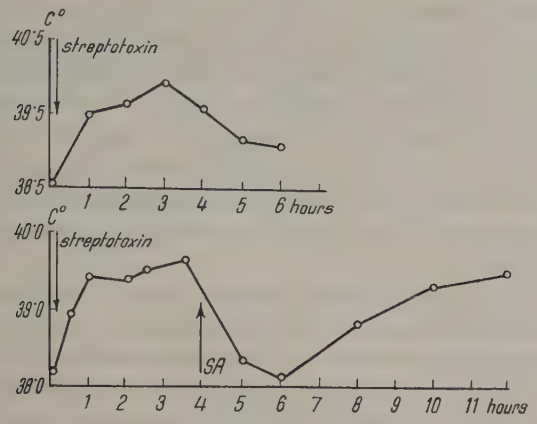



Fig. 8. Streptotoxin

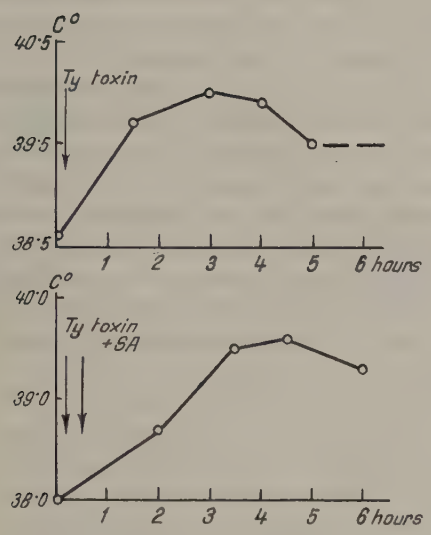



Fig. 9. Typhoid toxin

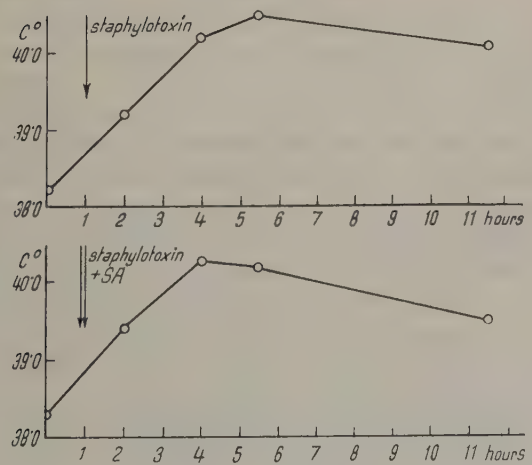



Fig. 10. Staphylotoxin

Our hypothesis that the antitoxic action of SA is located in the central nervous system and acts presumably by blocking the corresponding brain-cells for the toxins, was greatly strengthened by the following experiments:—

Minimal amounts (0·07 g for instance) of SA intracystically given inhibit completely the pyrogenic action of the colitoxin, while having no effect whatsoever on pyrexia due to puncture of the heat-centre (*Hp*).

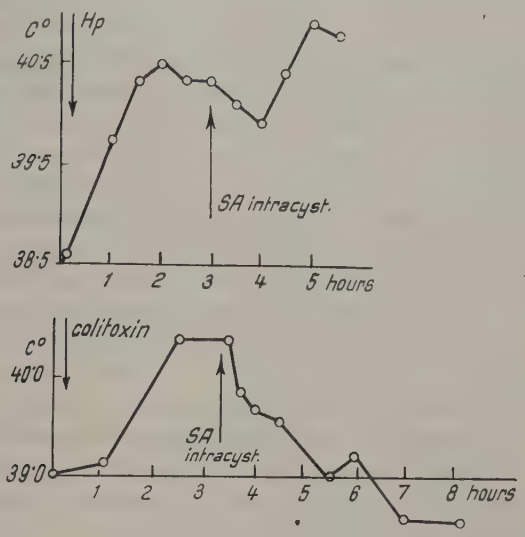



Fig. 12. SA intracysternally

## II. *The difference between chemical and infectious inflammation*

We now turn to the question of whether a connection can be established between the genesis of an infection and the nervous system, with other words:—Can we find experimental proof of a decisive role of the nervous system in the genesis of infections, as expected by our hypothesis?

As the general reaction of the organism to pathogenic germs is inflammation, and necrosis is seen rather exceptionally, this question is closely connected with the problem of the role the nervous system—that is innervation—plays in inflammation. There is a discordance of views in this respect, yet careful analysis of the literature leads to interesting and important results.

The communication of the laryngologist SPIESS[1] of Frankfurt that inflammations heal quickly or do not develop at all if the sensorial nerves are severed attracted general attention. Thus the opinion became prevalent that of the four classical symptoms of inflammation *dolor* is the dominant one. This view was strengthened by a case of polyarthritis of GAISBÖCK[2], in which, following an intercurrent hemiplegia, the inflammation of the joints receded on the anæsthetic side. There was a somewhat similar case of EISELSBERG (personal communication) in which a transversal injury of the spinal cord, caused by a motor accident, was accompanied by an erysipelas, the margins of

[1] G. SPIESS, Münchner med. Wschr. *53*, 345 (1906).
[2] D. GAISBÖCK, Arch. klin. Wschr. *121*, 339 (1917).

which demarcated the border of the anæsthetic region clearer than any neurologist could have done.

These clinical observations were not in agreement with the findings of experimental medicine. Bruce[1] investigated the problem experimentally by observing whether chemical substances that are known to cause inflammation, like mustard or croton oil, exert their action on tissues that have been anæsthetized by cutting the corresponding dorsal roots of the spinal cord, or which were completely disconnected from higher centres of the nervous system by transversal section of the spinal cord. The result of these investigations was that inflammation is not a reflex phenomenon and therefore in a very high grade independent of the central nervous system. This contradicted clinical experience and could be explained only by supposing that chemical inflammation and infectious inflammation are different processes.

But before I drew this conclusion, it seemed advisable to make sure whether inflammation can develop on denervated tissues. These investigations have been carried out by G. László in my institute on normal and denervated eyes of rabbits, with the result that chemical inflammation can be produced after extirpation of the ganglia Gasseri and even after degeneration of the sympathetic nerves.

This result seemed to me of great importance. The pathology of inflammation is well known, and we had no right to suppose that inflammation caused by dead matter differs from that caused by a living agent. The fact that, contrary to chemical inflammation, infectious inflammation does not develop if the nerves are severed, strongly supports our theory, according to which infectious viruses and toxins must wander along the nerves to the periphery to be able to attack the cells effectively. This conclusion was too far-reaching to be based solely on clinical observations, so that an experimental inquiry seemed necessary.

The most suitable object for this purpose seemed the small-pox vaccine, which is followed in rabbits unfailingly on the fifth day after vaccination by a characteristic pustule. We also know that rabbits once inoculated become immune against vaccine virus, and further inoculations remain ineffective. Our reasoning was, that if it is true that changes can be brought about by live germs only after they have reached the periphery through the nervous system, no pustule can develop on denervated skin. Our first experiments were performed on rabbits whose spinal cord had been sectioned in the cervical region. They were inoculated above and below this region, on their head and above their rump-bone.

The results were perfectly uniform and rather surprising. After the spinal cord has been severed at the level of the 7th cervical segment, we never saw a typical reaction, that is, a pustule in the lower region. There was sometimes a local reaction, mostly reddening of the skin, and in more severe cases necrosis of the superficial layers of the epidermis, but not once did we see pustules. As it might be conceivable that inoculation on the head might influence the result of the inoculation above the rump-bone, in some cases we inoculated only above the rump-bone, with the same result.

This method had its drawbacks. Section of the spinal cord is a rather severe operation, a great proportion of the animals die in post-operative shock, and their maximum term of life is 3–4 weeks; they have to be looked after constantly (e. g. catheterized), and the minor local reactions that were sometimes seen could be caused by the fact that the site of section, and even the origin of the nerves, is never quite the same in two animals. Therefore in the following my aim was to leave the central nervous system intact and denervate a part of the skin completely, dividing even the perivascular nervousc ommunications. We succeeded in doing so on the consideration that it takes months for a severed nerve to grow again into the damaged tissues, while the severed vessels do so in a considerably shorter time. We denervated a circular region of skin of 6–8 cm diameter over the rump-bone of a rabbit which was cut out in two sittings as shown in Fig. 13.

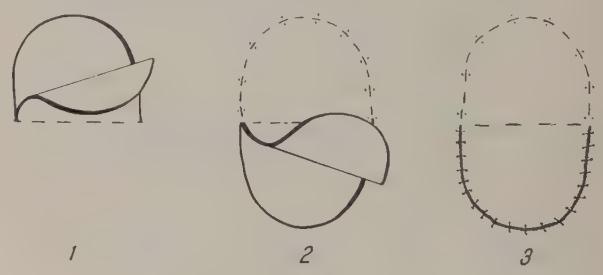



Fig. 13.

In the first operation the skin is cut in a semicircle and laid free with the subcutis down to the meridian (Fig. 13, No. 1), whereby blood-vessels and nerves coming from above the meridian are severed. This flap of skin is then laid back in its original position and sewn on as shown in the upper half of Fig. 13, No. 2. Then, after a pause of two weeks' time, the same operation is made on the lower half of the circle (Fig. 13, No. 2, lower half). Fig. 13, No. 3, shows the condition after the second operation.

The pause of two weeks is necessary, so that the blood supply of the upper semicircle can be reestablished from above, otherwise the cutting through the lower flap of skin would cause necrosis, as is the case if the whole circle is cut through at one time, freed and at once sewn on again.

Thus we were able to pursue our experiments on a very great number of rabbits, till the problem was wholly solved.

[1] N. Bruce, Arch. exp. Path. Pharm. *63*, 633 (1910).

First we repeated the experiments described above with the same result, but in this series not even the slightest local reaction was ever seen. The crosses drawn with the lancet remained clearly discernible throughout.

These experiments proved beyond doubt that small-pox develops only on skin connected by nerves to the central nervous system.

This result seemed so important that we had to reexamine the reaction of perfectly denervated skin to chemical inflammatory agents. We applied strips of charta sinapisata and emplastrum cantharidatum on the border of denervated and normal skin to see whether there is any difference between the reaction of the two regions. As a result we saw flush, inflammatory œdema, and sometimes blisters develop in both regions. But we were not content with that either. Ebbecke[1] was the first to describe that if we inject histamine into the skin and then inject a negatively charged colloidal dye like congo-red or trypane-blue intravenously, the histaminized skin stores the dye and changes its colour. This phenomenon was confirmed by many authors, but while Ebbecke and Hoff[2] saw its cause in the increased permeability of the vascular walls, Leszczynski[3] and later Jancsó[4] recognized it as being essentially an action of histamine on the histiocytes, the importance of which in the defensive role of inflammation was stressed by Jancsó. Thus the question of whether the accumulation of dyes following histamine takes place also in denervated skin became of particular importance. Our experiments answered it in the affirmative, as denervated and normal skin accumulated congo-red identically following the administration of histamine.

Having proved that the denervated skin reacts normally regarding its readiness for inflammation, we felt we were entitled to draw from our vaccine experiments the somewhat bold conclusion that the central nervous system plays an essential part in the development of vaccine pustules.

I must mention here that the neurotropy of small-pox virus is long known, there are countries like Spain, where vaccination is performed not with vaccine won from the udder of a cow but from the brain of rabbits inoculated with this virus.

There are two possible explanations for the inactivity of small-pox vaccine on denervated skin:—(1) either the vaccine wanders through peripheral nerves centripetally into the brain and from there returns to the skin again by way of the nerves, or (2) it passes through the lymph and blood into the nervous system and from there it reaches the inoculated skin sites by way of the nerves. The second alternative seems the more probable, since Calmette and Guerin have shown that if they inject vaccine virus intravenously and make a skin wound somewhere, the pustules occur on the wounded place.

To see which of the two possibilities is the right one, it must be tested whether an immunity occurs after inoculation on the denervated skin. For, if the inoculation is inactive after the denervation because the virus is not carried any further, then no immunity should occur. If, however, in spite of inactive inoculation, an immunity does occur, then it must be assumed that the virus has spread itself through the body, and the action has not appeared because, owing to lack of nerve-paths, it could not reach the periphery.

Our experiments led to the result that 10 days after the unsuccessful inoculation on the denervated skin the animals all became immune, since a second inoculation in any normal piece of skin was inactive.

Since the inactivity of the first inoculation was caused by the nerves being severed, the conclusion is justified that for the development of a pustule the vaccine virus must apparently penetrate the nervous system in order to damage the cells by way of the nerves. The fact that, after inactive inoculation, immunity can result, suggests that the nervous system plays a role in immunity, a point to which I shall return later.

First I wish to report some experiments which show a similar result to those just described. To see whether the prevention of the disease by denervation accompanied by immunity only occurred with vaccine virus, I wished to repeat the experiment with a second pathogenic germ and with a bacterium. To do so turned out to be more difficult than expected because neither dermatologists nor bacteriologists nor veterinarians know any bacteria that cause inflammation on the skin of rabbits. After a number of unsuccessful experiments I received from Prof. Fenyvessy a pneumococcus strain isolated from the pus of an abscess which caused an erysipelas-like inflammation on the skin of rabbits. Experiments with this strain led to the same result as those with vaccine virus:— on denervated skin, after its vascularization and therefore with its complete vitality has been restored, one could not provoke inflammation, but 8–10 days later the normal skin of the animal was immune as well.

### III. *Experiments on the possible role of the nervous system in the genesis of immunity*

The marvellous discoveries of the facts of immunity are certainly one of the prides of medical research, and if we study the critical survey of the actual material

[1] U. Ebbecke, Klin. Wschr. *2*, 1341 (1923).
[2] T. Hoff, Z. klin. Med. *102*, 745 (1926).
[3] Leszczynski, IIIe Congrès de l'Union des dermatologistes slaves (Prague 1934). Quoted from: St. L. Kwiatkowsky, Arch. f. Dermat. u. Syphilis *171*, 444 (1935).
[4] N. Jancsó, Magyar Orvosi Archivum *42*, 367 (1941) and Orvosi Hetilap *85*, 386 (1941).

in a recently published work of R. Doerr[1], we can see how modern methods of research, such as electrophoresis, electron microscope, use of heavy nitrogen ($N^{15}$), etc., have advanced our knowledge of the mode of genesis and the nature of the immune body. But if we look at these fundamental researches from the point of view of the physiologist, we recognize that some important points need further investigation, for example whether the much-studied immune body of blood serum really increases our understanding of immunity—congenital or acquired—? It is more than questionable whether this immune globulin of the blood serum is in effect the carrier of what is often a life-long immunity. But the new results of research leave no doubt that the immune globulin arises not in the blood but in the cells of organs, and it is certainly unfortunate that immune biology has somewhat neglected the problem of immunity itself in comparison with the study of the serum immune body. This defect is grounded on technical reasons, but we must not fall into the same error as histology once did in believing that the most clearly visible and most easily stained parts of the cell were the most important for the life of the cell. It should never be forgotten, as Doerr[1] expressly notes, that we can only investigate the so-called *humoral* factor of the antibody that arises in the body, while the second factor, the "sessile" or "cell constant" antibody is hardly considered owing to the technical difficulties, and we content ourselves with the assumption that "no important differences between the two forms need be assumed" (Doerr, l. c. p. 15).

Even if this is true, we must still raise the question, whether this sessile antibody is not the actual carrier of immunity. In regard to our experiments already described on the role of the nervous system in the genesis of infectious diseases, its role in the genesis of immunity should also be tested. It seems not improbable, and in any case worth testing, that the sessile antibodies are formed in the brain-cells under the influence of toxins and viruses, thus preventing a further, or rather a later, entrance of more of the poisonous substance, and that this blocking of the brain-cells would produce the immunity. That the central nervous system had something to do with immunity or, to be more exact, with the formation of antibodies, has been suggested by many authors before myself, to mention only Besredka[2], Reitler[3], Belák[4], Speransky[5], and Schlauk[6], and I would not pass over the fact that the hypothesis described above is very similar to the so-called Magrassi[1] phenomenon, which led to Doerr's[2] concept of *Schienenimmunität* (rail-immunity). According to this the mild or mitigated virus of herpes, which causes no encephalitis, hinders the encephalitogenic virus in reaching the brain when applied previously to the skin or cornea, because the mild virus wandering along the nerve robs this nerve, the "rail", of its ability to conduct the virus.

But we had still to test whether the antibody circulating in the blood and body fluids plays in fact the determining role usually ascribed to it in the genesis of immunity.

I approached this problem by the following experiments. Vaccinating a rabbit (A) in the usual way against small-pox, we waited till the reaction receded and the animal became immune, which normally takes 10 days. After waiting another day or two to be sure that there was no more virus present in the immune animal, it was brought into parabiosis with another animal (B) of the same litter *with communicating peritoneal cavities and the omenta cut and sewn to one another*. After 3–4 days both animals were inoculated with the result that no reaction was found—naturally—on the already immunized animal (A), but the animal B did not show the slightest trace of immunity, though living in joint circulation with an immune animal for days.

To see whether the parabiosis had really ensured the exchange of blood between the two animals, we first made the parabiosis in two pairs of animals and then inoculated the one animal A with vaccine virus and three days later separated the two animals again. After 8–10 more days, the second animal (B) was inoculated but without result, a sign that the virus with which the animal A had been inoculated had gone over with the blood to animal B and had immunized it. Thus we are justified in drawing the conclusion, from the first series of experiments carried out on three pairs of animals, that the small-pox immunity does not pass humorally to a second animal.

This experimental result has, however, a precursor. Grasset described in 1902 (Gaz. méd. de Paris) that one of the Siamese twins whose circulation communicated suffered from severe tuberculosis while the other remained perfectly healthy. Grasset concludes from this:—"...le grand appareil de défense n'est pas l'appareil circulatoire, mais le système nerveux", thus stating 46 years ago that the nervous system plays a part in immunity.

Grasset had of course no right to draw this conclusion, for his clinical observations did not give the slightest grounds for believing that immunity had anything to do with the nervous system.

[1] R. Doerr, *Die Immunitätsforschung*, Vol. 1, Antikörper. Teil 1 (Springer, Wien, 1947).

[2] A. Besredka, Handb. Technik u. Methodik d. Immunitätsforschung, Suppl. 1 (1911).

[3] R. Reitler, Wiener klin. Wschr. *37*, 267 (1924).

[4] A. Belák und L. Csereszнyés, Z. exp. Med. *52*, 572 (1926).

[5] A. D. Speransky, *Eine Grundlage für die Theorie der Medizin*, Allg.-path. Schriftenreihe, H. *2*, 18–37 (1941); Kongreßblatt f. d. ges. innere Med. *112*, 196 (1942).

[6] A. Schlauk, Deutsche med. Wschr. *64*, 1407 (1938).

[1] F. Magrassi, Boll. Acad. med., Roma *62*, 53 (1936).

[2] R. Doerr, Klin. Wschr. *15*, 1062 (1936).

Having regard to our experiments, which showed that the nervous system was important for the occurence of infection, we are now more justified in supposing that immunity operates in the nervous system. But we content ourselves with drawing from our parabiosis experiments the negative conclusion that acquired small-pox immunity is not transferable humorally and we have tried in another way to prove the significance of the nervous system for immunity:—

Our first reported experiments showed that a displacement of thyroxine, and also of the toxins, from the brain-cells is possible through those chemical substances which cure the corresponding diseases, namely the SA the neurotropy of which was first emphasized by MARX. If the nervous system should be the site of immunity, one might imagine that *in the brain-cells of immune animals sessile antibodies make the entrance or effectiveness of toxins and viruses impossible.*

Two facts support this possibility. We know that many infectious diseases, such as the well-known children's diseases, and also spotted fever, yellow fever, etc., leave a life-long immunity. Immunology supposes that in these cases the "immune bodies", which can no longer be traced in the blood, are "anchored" to the cells of different organs and are liberated in case of emergency. But immunologists forget that the cells of the organism perish continually and are replaced by new ones, so that in later years there is not even a trace of the cells to which in childhood the immune bodies might have become attached. The physiologist on the other hand knows that there is one organ, the cells of which are unable to regenerate, and this is the brain. Its cells escort us from the cradle to the grave. It is very interesting that an old master of immunology once likened immunity to memory, little knowing how near he came perhaps to the essence of this phenomenon.

The second fact which suggested the role of the nervous system in immunity was the effectiveness of PASTEUR'S protective inoculation against rabies, even when the virus is killed in the brain, as we now know.

It therefore had to be tested whether animals injected with brain substance were protected against the same disease instigator. For these experiments we used rabbits, and as infectious material always the same strain of bovine tuberculosis bacillus. The results of our first series of experiments were astonishing:— we injected 10 rabbits intravenously with 1·5 mg each of our very virulent Tb bacillus, and we killed them after 2 months. The lungs showed very severe tuberculosis. We then made a 50% emulsion of the brain, which was removed sterilely, in a sterile solution of sodium chloride. The emulsion, like all other brain substances which we used, was tested by experiments on guinea-pigs and found to be free of Tb bacilli. Then 14 rabbits were given *a single dose only* of 2 cc of brain emulsion subcutaneously, and 3 weeks later they were each given 1·5 mg Tb bacilli intravenously of the same strain with which the brain donor was injected. Out of 14 animals, 12 died within 3–10 days without demonstrable changes in the organs.

Control animals, which had not previously been treated, remained alive and only died of tuberculosis after some months. This seemed to us important, for it suggested that the brain of the infected animal contained something which reacted against the Tb bacillus.

In order to test whether it was not a coincidence, I repeated the experiment with coli bacilli in the following way:—3 rabbits were given an intravenous injection of living coli bacilli. The thickness of the emulsion corresponded to that used for vaccinations. The animals reacted with high fever (up to 42°C) but showed no other symptoms of disease. After 14 days, they were killed and the brain prepared, with the addition of 0·3% tricresol, as a 33% emulsion and injected subcutaneously into 3 rabbits in a single dose. After 3 weeks the animals were given an intravenous injection of the same coli culture as the brain donor. The result was that, out of 3 animals, one died 2 hours after the injection, the second one 24 hours after, and the third survived. Here also there seemed to be some substance in the brain of the infected animals which made the receiver animals over-sensitive to the coli bacilli used. That the brain substance itself does not cause over-sensitization we shall see later.

The fact that the brain substance of tuberculous animals apparently contains an antigen or antibody that reacts with the bacilli in the organism of the animal prompted us to repeat our Tb experiment in such a way that we injected the brain emulsion every second day for 3 weeks to desensitize the animals. The brain was from rabbits infected intravenously with Tb bacilli 2 months before their death, and all without exception showing very severe changes of the lungs. The 33% brain emulsion with 0·3% tricresol added was shown by tests on guinea-pigs to be free from Tb bacilli. Our brain emulsions were sufficient for 10 animals which each received 2 cc per dose, that is to say within 3 weeks each animal had a total amount of 20 cc with about 6 g of wet brain substance. One animal died during the injections. At the end of the pre-treatment, the 9 previously treated and 12 control animals (of which one died) were infected intravenously with 1·5 mg of Tb bacilli each. All 20 animals were killed after 2 months, at a time when experience shows that the disease is fully developed. When evaluating the results of these experiments, it should be remembered that the infection was carried out with very massive doses (suspension of 1·5 mg Tb bacilli intravenously), producing without exception most severe alterations in the lungs, which seem to be strewn with tubercles. The severity of the process has been marked

with 3–5 crosses according to number and size of the tubercles and the degree of proliferation, while disseminated tubercles have been marked with two, and single tubercles with one cross (see Table IV).

*Table IV*

| Untreated rabbits | Rabbits treated previously with brain emulsion of tuberculous rabbits |
|---|---|
| 1. ++++<br>2. +++<br>3. +++<br>4. +++<br>5. +++<br>6. +++<br>7. +++++<br>8. +++++<br>9. +++++<br>10. +++<br>11. +++ | 1. +<br>2. ∅<br>3. ++<br>4. +<br>5. +<br>6. ++<br>7. +++<br>8. ++++<br>9. + |

The difference is very marked and suggests that the brain of infected animals when administered over a longer period can produce a protective action in the majority of cases.

In view of the fact that this experimental series was too small to permit a final conclusion, I had the intention of making a further series of experiments with 50 rabbits. But for this an equal number of brain donors and control animals would be necessary, making 150 animals in all. In order to save animals within 2–3 months' time, I used the brain of severely tuberculotic beasts from the slaughter-house, the brains of one buffalo and one ox being prepared as an emulsion in the laboratory of the National Serum Institute in Budapest, in the same way as brains of sheep used for lyssa inoculation. This brain substance which was found in tests on guinea-pigs to be sterile, was now injected subcutaneously every second day for 3 weeks into 45 rabbits, while 5 rabbits were given one single dose of brain emulsion subcutaneously.

I shall first report on these last 5 animals, which only received a single dose of brain emulsion. Three weeks after this pre-treatment, they received 1·5 mg intravenously of Tb bacilli of the bovine strain which we usually used. In contrast to the experiments described previously, in which the brain donor and receiver were infected with the same bacillus culture, all 5 animals remained alive. Repetition of the experiment on 5 guinea-pigs gave the same result.

This experiment suggests that even amongst the bovine strains different types of Tb bacillus exist, and that the over-sensitization achieved with the brain substance in the previous experiments seems to be type-specific. No less interesting was the fate of the 45 previously treated rabbits which had received brain emulsion from the slaughter-house beasts over a period of 3 weeks.

After the pre-treatment, these animals, together with an equal number of control animals, were injected intravenously with 1·5 mg of our Tb bacilli. *The brain substance of the slaughter-house beasts had not produced a protective action in one single case.* Previously treated and control animals all showed equally the most severe alterations of the lungs.

It seems, therefore, that a protective action is only to be expected from such brain substance as is also able to produce over-sensitization with a single dose, and that both characteristics are apparently type-specific.

These experiments show also that the brain substance *per se* has no protective action, but only when it is gained from animals previously treated with disease instigators, and only, as we saw, with those with which the brain receiver was infected.

The discovery that the brain of infected animals contains type-specific substances must in any case be recognized as a step forwards. Admittedly it has still to be proved whether only the brain or also other organs contain such substances. If it should be found that this is a characteristic of the brain alone, it would be a strong support for our supposition that the central nervous system plays a central part in both the genesis of infectious diseases and in the process of acquired immunity.

Whether our experiments point in the right direction for a generally applicable organ therapy for infectious diseases, such that the Pasteur lyssa inoculation would be only a special case of a general law, cannot as yet be said. In any case, we see a new path opening for the testing of so-called sessile immune bodies, which have as yet been too much ignored by research on immunity. There seems to be no reason why bactericidal toxins or viruses taken up by the brain-cells should not transform certain protein substances, as has been shown in the case of the globulins of blood serum. From the total picture of our experimental results, it seems probable that the brain has a greater importance than hitherto suspected in the process of infection and of immunity, and that closer research on the sessile antibodies, especially of this organ, might lead to long-desired completion of the very successful serum research, and thus to the solution of many puzzling problems in our knowledge of immunity.

*Zusammenfassung*

Es wird zunächst die Arbeitshypothese geprüft, ob nicht die Entstehung und Lokalisation infektiöser Krankheiten erst dadurch entsteht, daß Bakterientoxine und Viren ähnlich dem Thyroxin von bestimmten Hirnzellen aufgenommen werden (Fieber!) und durch periphere Nerven in die Organzellen gelangen, um dort durch ihre Schädigung die Lebensbedingungen für die Krankheitserreger zu schaffen. Es konnte Folgendes gezeigt werden:

1. Sowohl die Thyroxinwirkung als auch jene der Bakterientoxine werden durch zentrale Wirkung der

Sulfonamide (SA) vernichtet. Für die zentrale Wirkung spricht, daß sehr geringe Mengen intrazystal gegeben volle Wirkung entfalten. Entsprechend den therapeutischen Erfahrungen waren die SA nur gegen die Toxine von Koli, Pneumokokken und Streptokokken wirksam und versagten vollkommen gegenüber Staphylococcus-, Typhus- und Dysenterietoxinen.

2. Während an vollkommen entnervten Hautpartien – wie bekannt – chemische Entzündung zustandekommt, konnte sowohl durch Pockenvakzine als auch durch einen hautentzündungserregenden Pneumokokkenstamm keine Entzündung erzielt werden, was dafür sprach, daß nicht die Entzündung selbst, sondern die Infektion durch die Entnervung verhindert wird.

3. Die weitere Tatsache, daß sich trotz Ausbleibens der Infektion Immunität entwickelte, führte zu der Möglichkeit, daß der eigentliche Sitz der Immunität jene Hirnzellen sind, von welchen das Toxin aufgenommen wurde und daß die in diesen entstandenen sessilen Antikörper das spätere Eindringen, also das Wirksamwerden des Toxins verhindern.

4. Durch Parabioseversuche an Kaninchen, welche zeigten, daß bei gemeinsamem Blutkreislauf an zwei Geschwistern die Impfung des einen Tiers auch im zweiten Immunität hervorruft, wurde diese Annahme gestützt. Wird aber ein schon immunisiertes Tier mit einem zweiten zusammengenäht, so erlangt letzteres trotz gemeinsamen Kreislaufes keine Immunität.

5. Zur Prüfung, ob in den Hirnzellen «sessile Antikörper» vorhanden sind, wurde Hirnsubstanz von tuberkulösen Kaninchen an normale Tiere verimpft. Dabei zeigte sich:

a) *Einmalige* Injektion der (sterilen) Hirnsubstanz macht die Tiere spezifisch gegenüber jenem Tbc-Stamm mit welchem das Spendertier infiziertwurde, überempfindlich. Dasselbe konnte mit dem Hirn koliinfizierter Kaninchen erzielt werden.

b) Nach *wiederholter* Impfung mit Hirnsubstanz (3 Wochen lang jeden 2. Tag) tuberkulöser Kaninchen zeigten dagegen unsere Versuchstiere entschiedene Resistenz gegen eine nachfolgende Infektion, aber nur in dem Fall, wenn die Infektion mit dem gleichen Tbc-Stamm erfolgte, der auch für die Infizierung der Hirnspender verwendet wurde. Es scheint demnach nicht ausgeschlossen, daß die PASTEURsche Lyssaimpfung nur einen speziellen Fall einer allgemeinen Gesetzmäßigkeit darstellt.

# Brèves communications - Kurze Mitteilungen
# Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

## Die Dehydrierung primärer und sekundärer Alkohole mit N-Chlorsuccinimid

Kürzlich berichteten HEBBELYNCK und MARTIN an dieser Stelle[1] über die Chlorierung von Toluol und der Xylole mit N-Chlorsuccinimid. Diese Autoren beobachteten ferner die dehydrierende Wirkung dieser Verbindung auf Benzylalkohol und Benzhydrol, wobei sie in guter Ausbeute Benzaldehyd bzw. Benzophenon erhielten. Da in unserem Laboratorium seit einiger Zeit die Verwendung von N-Chlorsuccinimid zur präparativen Herstellung von Aldehyden und Ketonen studiert wird, sehen wir uns durch die erwähnte Mitteilung veranlaßt, jetzt schon über unsere bisherigen Untersuchungen zu berichten.

Zwecks Auffindung neuer Methoden zur Dehydrierung primärer und sekundärer Alkohole haben wir eine Reihe von N-halogenierten Säureamiden auf ihre Eignung als Dehydrierungsmittel untersucht. Wir fanden, daß N-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstofflösung Benzylalkohol in guter Ausbeute zu Benzaldehyd dehydriert, besonders in Gegenwart von Pyridin, welches zur Bindung des entstehenden Bromwasserstoffs dient. Da die bekannte bromierende Wirkung des N-Bromsuccinimids auf ungesättigte Verbindungen für unsere Zwecke störend in Erscheinung trat, untersuchten wir das N-Chlorsuccinimid, welches nach ZIEGLER[1] keine analoge Chlorierung zur Folge hat.

Die oxydierende Wirkung von N-Chlorsuccinimid wurde schon vor langer Zeit von SELIWANOW[2] beschrieben. Dieser Autor stellte fest, daß primäre und sekundäre Alkohole, nicht aber die tertiären, von diesem Reagens angegriffen werden und schlug dieses unterschiedliche Verhalten zur Erkennung der tertiären Natur von Alkoholen vor, ohne aber irgendwelche Einzelheiten bekanntzugeben. Daß auch andere N-halogenierte Säureamide auf Alkohole dehydrierend wirken können, geht aus einer Beobachtung von CHATTAWAY und ORTON[3], welche unter den Produkten der Einwirkung von N-Bromacylaniliden auf Äthanol Acetaldehyd nachwiesen, hervor. Ferner nahm TSCHERNIAK[4] auf Grund seiner Versuche an, daß die oxydierende Wirkung der N-Chlor-Säureimide, wie N-Chlorsuccinimid und N-Chlorphthalimid, nicht auf die vorübergehende Bildung von unterchloriger Säure zurückzuführen sei, wie es SELIWANOW annahm, sondern daß diese Verbindungen Oxydationsmittel für sich seien.

Wir sind damit beschäftigt, die dehydrierende Wirkung von N-Chlorsuccinimid auf primäre und sekundäre

[1] M. F. HEBBELYNCK und R. H. MARTIN, Exper. *5*, 69 (1949).

[1] K. ZIEGLER, A. SPÄTH, E. SCHAAF, W. SCHUMANN und E. WINKELMANN, Annalen *551*, 80 (1942).

[2] TH. SELIWANOW, Ber. Dtsch. chem. Ges. *25*, 3617 (1892).

[3] F. D. CHATTAWAY und K. J. P. ORTON, Ber. Dtsch. chem. Ges. *32*, 3573 (1899).

[4] J. TSCHERNIAK, Ber. Dtsch. chem. Ges. *34*, 4209 (1901).

Alkohole auf breiter Basis zu untersuchen und haben bis jetzt in allen Fällen die entsprechenden Aldehyde und Ketone in zum Teil guten Ausbeuten in Form ihrer 2,4-Dinitrophenylhydrazone isolieren können. Es wurden möglichst verschiedenartige Alkohole untersucht, darunter die folgenden: Äthanol, Butanol, Gärungsamylalkohol, Cyclohexanol, Cholesterin, Zimtalkohol, Benzylalkohol und Benzhydrol. Die Reaktion verläuft mit sehr verschiedener Leichtigkeit. Während bei den beiden letztgenannten Alkoholen die Reaktion in Benzol oder Tetrachlorkohlenstoff unter Zusatz der berechneten Menge Pyridin nach kurzem Anwärmen einsetzt, ist z. B. im Falle des Cholesterins längeres Erhitzen auf 100° in Pyridin notwendig. Soweit bis jetzt untersucht werden konnte, reagieren die niederen aliphatischen Alkohole schon unter milden Bedingungen sehr schnell. Als besonders träg erwies sich der Zimtalkohol. Als Lösungsmittel wurden verwendet: Tetrachlorkohlenstoff, Chlorbenzol oder Benzol mit oder ohne Zusatz von Pyridin; ferner Eisessig unter Zusatz von Natriumacetat sowie tertiärer Amylalkohol.

Über den Mechanismus der Reaktion lassen sich auf Grund unserer bisherigen Versuche keine Schlüsse ziehen. Insbesondere muß die Wirkung von Zusätzen, welche den Verlauf der Ziegler-Wohl-Reaktion beeinflussen[1], erst noch abgeklärt werden. Wir versuchen ferner, den Anwendungsbereich und die präparative Eignung dieser Reaktion festzulegen. Über die Resultate dieser Untersuchung wird an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden.

C. A. Grob und Hj. U. Schmid

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, den 15. Februar 1949.

*Summary*

The dehydrogenation of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones by N-chlorosuccinimide as first observed by Seliwanow has been found to be of wide applicability. Although the ease of the reaction varies considerably with the nature of the alcohol under observation, in all cases so far studied the corresponding aldehydes and ketones were obtained. The scope and mechanism of the reaction are under further investigation.

[1] H. Schmid und P. Karrer, Helv. chim. acta *29*, 573 (1946). – H. Schmid, Helv. chim. acta *29*, 1144 (1946).

---

## Über neuartige Additionsverbindungen des Harnstoffs

Als Säureamid ist Harnstoff befähigt, mit Säuren Salze zu bilden. Darüber hinaus kennt man eine große Anzahl additioneller Verbindungen von Harnstoff mit Metallsalzen, z. B. Natriumchlorid, Quecksilber-, Aluminium- oder Chromsalzen. Molekularverbindungen im klassischen Sinn sind schließlich die Anlagerungsprodukte von Wasserstoffsuperoxyd $CO(NH_2)_2 + H_2O_2$ sowie Methanol $CO(NH_2)_2 + CH_3OH$.

Als gemeinsam für die aufgezählten Verbindungen kann hervorgehoben werden, daß die Partner des Harnstoffes polare Natur besitzen und daß die Molverhältnisse zwischen Harnstoff und Partner den Regeln der Stöchiometrie bzw. der Koordinationslehre entsprechen.

Durch Verfolgung einer glücklichen Zufallsbeobachtung stieß der eine von uns[1] im Jahre 1940 auf die ganz unerwartete Tatsache, daß sich Harnstoff mit Paraffinkohlenwasserstoffen zu kristallinen Additionsverbindungen vereinigt. Diese sind in fester Form durchaus haltbar. In Berührung mit Lösungsmitteln dagegen – seien es Harnstofflöser, seien es Paraffinlöser – zerfallen sie mehr oder weniger rasch in die Komponenten.

Eine gewisse Mindestgröße der Kohlenstoffkette des Paraffins ist für die Existenzfähigkeit der Addukte Bedingung; die Kette muß wenigstens sechs Glieder enthalten. Je größer das Paraffinmolekül ist, desto leichter erfolgt die Bildung und desto größer ist die Beständigkeit der Addukte. Eigentümlicherweise spielt für Bildung und Beständigkeit auch die *Gestalt* des Paraffinmoleküls eine wesentliche Rolle: während die geradkettigen Paraffine mit Harnstoff leicht zusammentreten, ist die Fähigkeit zur Adduktbildung bei verzweigten Paraffinen viel geringer, bei hochverzweigten sogar Null.

Es hat sich gezeigt, daß die Fähigkeit des Harnstoffs zur Bildung von Addukten der geschilderten Art nicht auf die Anlagerung von Paraffinen beschränkt ist. In der gleichen Weise werden ungesättigte Kohlenwasserstoffe gebunden; ebenso Alkohole, Äther, Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren, Ester; darüber hinaus Amine, Thioverbindungen, Halogenide, kurz überhaupt alle aliphatischen Verbindungen, soweit sie eine gewisse Mindestkettenlänge aufweisen und nicht verzweigt (oder höchstens schwach verzweigt) sind. Zyklische Verbindungen werden im allgemeinen von Harnstoff nicht angelagert. Auf dieses verschiedenartige Verhalten des Harnstoffs kann man Verfahren zur Trennung von Gemischen gründen[1].

Das eingehende Studium und die Strukturuntersuchung dieser neuen organischen Additionsverbindungen hat zu höchst überraschenden Ergebnissen geführt. Man hat in den geschilderten Addukten einen neuartigen Typ von Additionsverbindungen vor sich, in denen die Partner nicht nach den aus der Koordinationslehre abzuleitenden Verhältniszahlen vereinigt sind, sondern deren Kristalle nach einem gänzlich andersartigen Prinzip aufgebaut sind. Über diese Arbeiten wird in Kürze an anderer Stelle[2] ausführlich berichtet werden.

F. Bengen und W. Schlenk jr.

Ammoniaklaboratorium der Badischen Anilin- und Sodafabrik Ludwigshafen am Rhein, den 22. September 1948.

*Summary*

It has been found that urea is capable of forming addition products with a great number of aliphatic compounds of various kind. The partners must have a chain structure the chain being straight or branched within certain limits. As a rule, the chain must contain at least six members or more. Cyclic compounds are generally not added to urea. Processes of separating mixtures of organic compounds can be based upon their different behaviour towards urea.

The newly discovered addition products represent a type unknown so far. The structure of their crystals differs from that known from the classic theory of the complex chemistry.

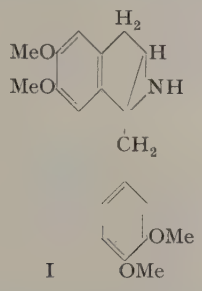
[1] F. Bengen.

[1] Die diesbezüglichen Ergebnisse aus den Jahren 1940 bis 1944 sind in der grundlegenden Anmeldung von F. Bengen und in weiteren Anmeldungen beim Reichspatentamt niedergelegt.

[2] Liebigs Annalen (1949).

## Konstitution und Bildungsmechanismus des Pavins[1]

Für das Pavin, ein Reduktionsprodukt des Papaverins[2], hat F. L. PYMAN die Konstitutionsformel I aufgestellt[3]. Nun läßt sich aber N-Methyl-pavin durch konz. Brom- oder Jodwasserstoffsäure glatt entmethylieren, und die Rückmethylierbarkeit des Verseifungsproduktes zu N-Methyl-pavin-jodmethylat beweist, daß das Pavinskelett hierbei erhalten bleibt. Das spricht entscheidend gegen die Formel I, die einen Äthylenimin-

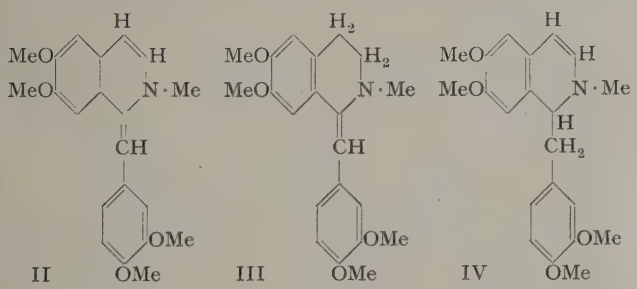


I

ring enthält, der durch Mineralsäuren spielend leicht aufgespalten werden sollte. Ebenso spricht gegen diese Formel, daß wir bei der Oxydation des Pavins oder seiner *des*-Base niemals auch nur spurenweise Veratrumaldehyd oder Veratrumsäure erhielten.

Ein neuer Strukturvorschlag ergibt sich nun auf Grund einer neuen, quantitativ verlaufenden Bildungsweise des Pavinskeletts.

Bereits vor längerer Zeit hatten wir das aus Papaverin-jodmethylat mit Natriumalkoholat erhältliche N-Methyl-dihydro-isopapaverin (II) durch katalytische Hydrierung in eine Dihydroverbindung übergeführt, für die die Formeln III und IV zur Wahl standen. Aus der Annahme heraus, daß in II die Doppelbindung in der 3,4-Stellung weniger sterisch gehindert und daher leichter hydrierbar sein könnte als die zwischen den Benzolkernen stehende Doppelbindung, hatten wir für die Dihydrobase die Konstitution III angenommen[4]. Tatsächlich hat aber die aus II erhaltene Dihydrobase die Konstitution IV.

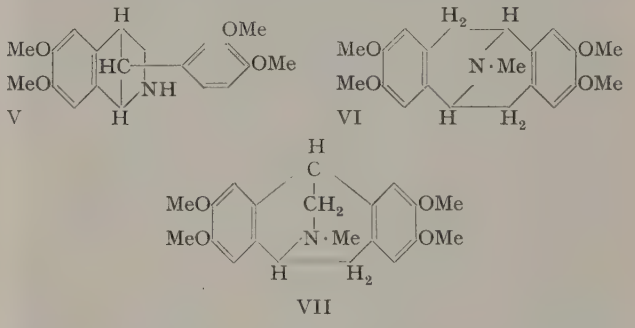


II III IV

Während nämlich eine aus dem Jodmethylat des synthetisch gewonnenen 3,4-Dihydro-papaverins dargestellte, mit der aus II erhaltenen Dihydroverbindung isomere Dihydrobase vom Schmelzpunkt 117–118° der einwandfreien Konstitution III mit Ozon Veratrumaldehyd und Veratrumsäure liefert, gibt die aus II erhaltene Dihydrobase vom Schmelzpunkt 130–131° mit Ozon auch nicht spurenweise Veratrumaldehyd oder Veratrumsäure. Das beweist, daß sie nicht die Konstitution III haben, also auch zu der aus 3,4-Dihydropapaverin dargestellten Base III nicht im Verhältnis der cis-trans-Isomerie stehen kann. Es muß ihr danach sowie wegen ihrer Bildung aus N-Methylisopapaverin (II) und wegen ihrer weiteren Überführbarkeit in Laudanosin die Konstitution IV des N-Methyl-1,2-dihydropapaverins zukommen. Bei der katalytischen Hydrierung von II wird unter den von uns gewählten Bedingungen eigenartigerweise ausschließlich die zwischen den aromatischen Ringen liegende Doppelbindung hydriert.

Während sich nun die Dihydrobase III mit Brom- oder Jodwasserstoffsäure glatt entmethylieren läßt, ohne daß die Doppelbindung verschwindet oder das Gerüst des Moleküls sich ändert – das Produkt der Entmethylierung ist zu Laudanosolin hydrierbar –, geht das N-Methyl-1,2-dihydro-papaverin (IV) beim Kochen mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure unter Verseifung der Methoxygruppen und unter Verschwinden der Doppelbindung quantitativ in das bei 215–220° schmelzende Bromhydrat des N-Methyl-norpavins über. Seine Rückmethylierung liefert quantitativ das quartäre Salz des N-Methylpavins; es war identisch mit einem aus Pavin dargestellten Vergleichspräparat. Die Überführung von III in ein Pavinderivat ist auch ohne gleichzeitige Entmethylierung möglich; beim Erwärmen mit sirupöser Phosphorsäure geht die Base III in etwa 50% Ausbeute in N-Methyl-pavin über.

Das Verschwinden der Doppelbindung in der 3,4-Stellung des N-Methyl-1,2-dihydro-papaverins (III) bei diesen Übergängen muß darauf beruhen, daß sich an sie ein Teil des Moleküls anlagert. Aus sterischen Gründen kommt nur eine Anlagerung der in III zum Veratrolrest führenden $CH_2$-Gruppe unter Bildung von V[1] oder eine Anlagerung des Veratrolrestes selbst mit dem p-Wasserstoffatom unter Bildung von VI (mit 8-Ring) bzw. VII (mit 7-Ring) in Frage.

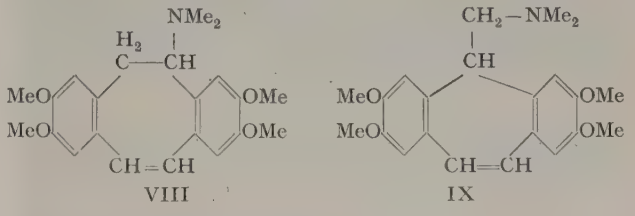


V VI



VII

Nur von den Formeln VI und VII lassen sich *des*-Basen (VIII bzw. IX) ableiten, die die beim HOFMANNschen Abbau entstandene Doppelbindung in einem Ring enthalten, deren Oxydation also zu einer Dicarbonsäure mit gleichviel Kohlenstoffatomen führen muß, so wie dies PYMAN beobachtet hat. Diese Formeln erklären auch allein zwanglos, warum aus Pavin und seinen Abbauprodukten durch Oxydation niemals Veratrumsäure erhalten wird.



VIII IX

[1] Vorläufige Mitteilung aus dem Institut für organische Chemie der Techn. Hochschule in Darmstadt. Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. PAUL KARRER, Zürich, zum 60. Geburtstag gewidmet.

[2] Vgl. T. A. HENRY, *The Plant Alkaloids* (1939) p. 190.

[3] J. Chem. Soc. *107*, 176 (1915).

[4] C. SCHÖPF und K. THIERFELDER, Liebigs Ann. *497*, 22 (1932).

[1] Die Bildung eines 4-Ringes wäre auch denkbar, erscheint aber gegenüber V als unwahrscheinlich.

Die Entscheidung zwischen den Formeln VI und VII hat sich bisher noch nicht treffen lassen. Der oxydative Abbau der *des*-Base hat uns eine Reihe von Oxydationsprodukten geliefert, deren Konstitution aber noch nicht geklärt werden konnte; nur Metahemipinsäure konnte identifiziert werden. Es muß also vorläufig noch offen bleiben, ob Pavin der Konstitution VI oder VII entspricht. Hat es die Konstitution VI, so wäre das deshalb von besonderem Interesse, weil dann bei den Abbauprodukten des Pavins, die Derivate des 1, 2, 5, 6-Dibenzo-cyclooctadien-(1, 5)-Rings darstellen, neuartige Isomerieerscheinungen zu erwarten sind, die zum Teil den bei den isomeren Disalicyliden beobachteten[1] entsprechen könnten.

Mit dem Übergang zum Pavinskelett sind einige auffallende Änderungen im chemischen Verhalten verbunden. So geht z. B. das Jodmethylat der *des*-Base des Pavins schon beim Kochen mit Wasser bzw. Alkohol unter Abspaltung von Trimethylamin-jodhydrat in einen Alkohol bzw. Äther über, und erleidet keineswegs, wie man erwarten sollte, besonders leicht den Hofmannschen Abbau. Auch die Bildung eines Neutralkörpers der Summenformel $C_{20}H_{22}O_5$ vom Schmelzpunkt 215–217° schon bei der ersten Stufe des Hofmannschen Abbaus neben der Bildung der *des*-Base VIII bzw. IX gehört zu den überraschenden Reaktionen dieses Ringsystems, die durch weitere Untersuchungen geklärt werden müssen.

Durch die vorliegende Untersuchung ist der Mechanismus der Bildung des N-Methyl-pavins bei der Reduktion des Papaverin-jodmethylats mit Zinn und Salzsäure geklärt. Offenbar ist das erste Reduktionsprodukt das hierbei nicht faßbare N-Methyl-1, 2-dihydro-papaverin (IV), das unter dem Einfluß der Salzsäure sich zum Teil zu dem nicht weiter reduzierbaren N-Methylpavin stabilisiert, zum größten Teil aber zu Laudanosin weiter reduziert wird. In analoger Weise muß bei der Reduktion des Papaverins das Pavin über das noch unbekannte 1, 2-Dihydro-papaverin (IV; NH statt NMe) gebildet werden. Bei rasch verlaufender Reduktion mit Zinn, das mit 1,6% Antimon legiert ist, entsteht dabei praktisch kein Pavin, da die Weiterreduktion zu Tetrahydropapaverin schneller als die Stabilisierung zum Pavinsystem erfolgt. Bei langsamerer Reduktion mit reinem Zinn tritt dagegen Pavinbildung bis zu 35% der Theorie ein[2].

An der Durchführung der vorstehenden Arbeit waren Frl. M. Bormuth, Frl. L. Schottenhammer und Herr W. Vollrath beteiligt.

C. Schöpf

Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule in Darmstadt, den 16. Februar 1949.

*Summary*

A new way of formation of *N*-methyl-pavine from *N*-methyl-1, 2-dihydro-papaverine is described. New structural formulæ for pavine are brought forward as well as the reaction mechanism is cleared up with regard to its formation by the reduction of papaverine with tin and hydrochloric acid.

[1] Vgl. L. Anschütz und R. Neher, Ber. Dtsch. chem. Ges. *77*, 634 (1944).

[2] Beobachtung von K. Falk.

## Dependence, in Yeasts, of Phosphate Uptake and Polymerization upon the Occurrence of Glucose Polymerization[1]

Accumulation of phosphate by phosphate-deficient, non-dividing yeast cells metabolizing glucose has been shown[2] to result in the formation of metaphosphate in the cells. The necessity of a metabolizable substrate for phosphate uptake by yeast cells is well known[3] while inhibition of carbohydrate metabolism by cyanide inhibits both phosphate uptake and metaphosphate formation. The separation of glucose polymerization (aerobic assimilation) from glucose oxidation by the action of dinitrophenol and azide is well known[4]; the inhibitory action of DNP and azide on phosphate uptake is also known[5].

Promotion of aerobic assimilation of glucose by yeasts by addition of riboflavin was found to be accompanied by increased phosphate uptake[6]; the rate of glucose oxidation was not accelerated by the riboflavin addition.

The effects of $NaN_3$, DNP, and riboflavin on phosphate uptake and polymerization and on glucose consumption and polymerization have been studied concurrently on non-dividing, aerated suspensions of brewer's yeast, *Saccharomyces cerevisiæ* (Carlsberg strain No. 237). The techniques employed were: phosphate uptake (labeled $P^{32}$), phosphate polymerization (Wiame-Brachet, toluidine blue, quantitative basophily), glucose consumption (colorimetric analysis), and aerobic assimilation (increase in dry weight of non-dividing cells in a non-nitrogenous medium). The cells were rendered phosphate-deficient by growing an initial inoculum of 4·7 g wet weight in 3 passages through Wiame's phosphate-discharging medium (a glucose, ammonium sulfate, succinate buffer without phosphate) during a period of 3 days; only 10% increase in wet weight occurred during the final passage, and the cells had a smaller percentage dry weight than those of the inoculum.

As shown in the Table, $5 \cdot 10^{-4}$ *M* $NaN_3$ and $5 \cdot 10^{-4}$ *M* DNP completely suppress phosphate uptake, phosphate polymerization (basophily), and glucose polymerization, but cause only slight decreases in glucose consumption (oxidation). The control phosphate-deficient cells respond to the addition of phosphate by a marked phosphate uptake and polymerization, and aerobic assimilation of glucose. The smaller inhibitions in basophily and glucose assimilation prompted by $10^{-4}$ *M* DNP are identical, within the accuracies of the methods. Addition of riboflavin ($10^{-5}$ *M*) promoted increases in phosphate uptake, basophily, and dry weight; this concentration of riboflavin is about 100 times that obtainable if all the riboflavin naturally contained in the cells employed were to be released. At the concentrations studied, riboflavin did not antagonize the action of DNP and $NaN_3$. Before supplying phosphate to the control cells they have a very low basophily; iodine, and other glycogen stains show an almost complete absence of glycogen. Control cells maintained without phosphate during the test showed no increase in basophily or gain

[1] Presented, in part, before the Society for General Microbiology, London, March 24, 1948.

[2] J. M. Wiame, Biochimica et biophysica acta *3*, 234 (1947).

[3] L. J. Mullins, Biol. Bull. *83*, 326 (1942).

[4] C. E. Clifton, Adv. in Enzym. *6*, 269 (1946).

[5] R. D. Hotchkiss, Adv. in Enzym. *4*, 153 (1944). – S. Spiegelman, M. D. Kamen, and R. Dunn, Fed. Proc. *5*, 99 (1946).

[6] W. J. Nickerson and L. J. Mullins, Nature *161*, 939 (1948).

Effect of DNP, $NaN_3$, and riboflavin on phosphate uptake, phosphate polymerization, glucose consumption, and glucose assimilation by phosphate-deficient suspensions of *Saccharomyces cerevisiæ*.

Total volume of 50 ml per vessel; suspensions agitated during 4-hours' experimental period.

| Addition to WIAME Medium $+M/30$ $KH_2PO_4$ | Phosphate polymerization (basophily) (initial extinction) = 0·64/mg) | Phosphate uptake ($P^{32}$ activity) | Glucose assimilation (initial dry wt. yeast = 47 mg/vessel) | Glucose consumption (initial glucose = 106 mg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| | extinction/mg dry wt. | % Standard | mg dry wt. yeast/ vessel | mg/ml |
| None | 2·00 | 247. | 63. | 13·8 |
| DNP $5 \cdot 10^{-4}M$ | 0·64 | 0 | −5. | 10·6 |
| DNP $10^{-4}M$ | 1·50 | 248. | 55. | 14·6 |
| $NaN_3$ $5 \cdot 10^{-4}M$ | 0·64 | 4·8 | −7. | 12·3 |
| Riboflavin $10^{-5}M$ | 2·15 | 303. | 70. | 15·4 |
| Riboflavin $2 \cdot 5 \cdot 10^{-6}M$ | 2·13 | 314. | 70. | 17·0 |
| DNP $5 \cdot 10^{-4}M$ + Riboflavin $2 \cdot 5 \cdot 10^{-6}M$ | 0·57 | 10·2 | −2. | 6·0 |
| $NaN_3$ $5 \cdot 10^{-4}M$ + Riboflavin $2 \cdot 5 \cdot 10^{-6}M$ | 0·71 | 7·2 | −4. | 13·1 |

in dry weight. The 235% gain in dry weight of the control cells supplied phosphate during the test contrasts sharply with the non-phosphate controls and with the actual loss in dry weight by the cells during their third passage through the phosphate-discharging medium. Thus the actual necessity of phosphate for glucose polymerization is clearly indicated.

The concurrent inhibition of phosphate uptake, phosphate polymerization, and glucose polymerization, without impairment of glucose oxidation, points to an interdependence of the processes inhibited, as already suggested[1]. In view of the participation of the CORI ester in glucose polymerization by yeasts, these results suggest that glycogen and polymerized phosphate may be formed simultaneously from glucose-1-phosphate *in vivo*. The *stimulation* of aerobic assimilation in yeasts by *external* phosphate has long been known[2] but difficult to reconcile with the limiting effect of phosphate on the glucose-1-phosphate $\rightleftharpoons$ glycogen + phosphate equilibrium *in vitro*[3]. A coupling between the polymerization of glucose and of phosphate in yeasts is very likely in view of the facts: agents (metabolizable substrate, external phosphate, riboflavin) necessary for, or increasing, the one process, increase the other; agents (DNP, $NaN_3$) inhibiting the one inhibit the other; the occurrence of one has not been observed in the absence of the other; the ratio of the amounts of the two polymerization products is approximately one.

Polymerization of phosphate from glucose-1-phosphate would constitute an efficient mechanism to account for the accumulation of the ion by non-dividing metabolizing cells against a concentration gradient. In light of the probably very high molecular weight of polymetaphosphate in *Aspergillus niger*[4] and in yeast[5], the production of high energy phosphate bonds of metaphosphate from glucose-1-phosphate assumes thermodynamic possibility–through operation of a BERGMANN principle (polymer product insolubility) reaction[6], and simultaneously provides a way whereby the equilibrium, unfavorable with respect to glycogen *in vitro*, may be driven *in vivo* towards polymerization, as accomplished by the addition of $Ba^{++}$ *in vitro*. Since assimilation of $^2/_3$ of the glucose supplied to yeasts is commonly observed, the cell must possess a mechanism more efficient than $Ba^{++}$ for shifting the equilibrium: glucose-1-phosphate $\rightleftharpoons$ glycogen + phosphate. It appears this mechanism may be:—

glucose-1-phosphate = glycogen + polymetaphosphate

Formation of polyhexametaphosphate would agree with the known 6-unit polymerization of glycogen.

The author wishes to thank Prof. Ø. WINGE for kindly extending the use of facilities at the Carlsberg Laboratorium, and to thank Prof. K. LINDERSTRØM-LANG for much valued discussion, especially of the BERGMANN principle reaction.

W. J. NICKERSON[1]

Carlsberg Laboratory, Copenhagen, December 30, 1948.

*Zusammenfassung*

Es wird der Nachweis geführt, daß die Hemmung der Glukosepolymerisation (ohne Hemmung der Glukoseoxydation) durch Dinitrophenol und Natriumazid mit einer Hemmung der Phosphataufnahme und -polymerisation parallel geht. Bei Verwendung von phosphatarmen Hefezellen ist die Ingangsetzung der Glukosepolymerisation (nicht der Glukoseoxydation) von der Gegenwart von Phosphat im Nährmedium abhängig. Gleichzeitige Vermehrung von Phosphataufnahme, Phosphatpolymerisation und Glukosepolymerisation konnte durch Zugabe von Riboflavin zu Suspensionen von Hefe, die unter Mangelbedingungen gezüchtet war, erreicht werden. Es wird die Auffassung vertreten, daß Hefezellen, die Glukose in Gegenwart von Phosphat umsetzen, Glykogen (=polymerisierte Glukose) und Metaphosphat (polymerisierte Form) gleichzeitig aus Glukose-I-Phosphat bilden. Für diese Annahme sprechen thermodynamische Überlegungen über den Polymerisationszustand von Metaphosphat.

[1] W. J. NICKERSON and L. J. MULLINS, Nature *161*, 939 (1948).

[2] R. A. MCANALLY and I. SMEDLEY-MACLEAN, Biochem. J. *29*, 2236 (1935).

[3] C. F. CORI, in: *Symposium on Respiratory Enzymes*, (Univ. Wisconsin Press, Madison, 1942).

[4] B. INGELMAN and H. MALMGREN, Acta chem. Scand. *1*, 422 (1947).

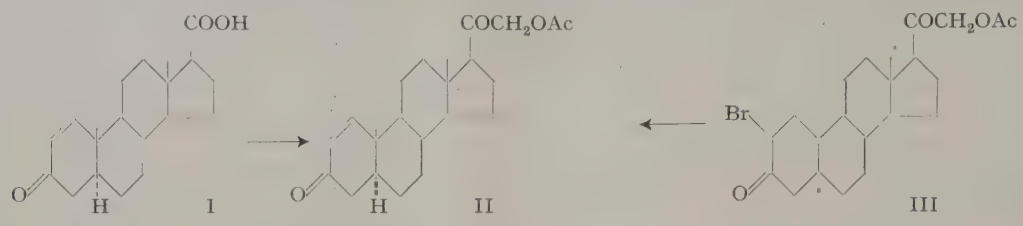
[5] G. SCHMIDT, L. HECHT, and S. J. THANNHAUSER, Fed. Proc. *6*, 289 (1947). – J. M. WIAME, Fed. Proc. *6*, 302 (1947).

[6] M. BERGMANN and J. S. FRUTON, Ann. N. Y. Acad. Sci. *45*, 409 (1944).

[1] JOHN SIMON Guggenheim Memorial Fellow, 1947–8. Present address: Arnold Biological Laboratory, Brown University, Providence, R. I.

## $\Delta^1$-Desoxycorticosterone Acetate

The recent interest[1] in analogues of desoxycorticosterone acetate prompts us to record the synthesis and biological activity of $\Delta^1$-*allo*pregnen-21-ol-3,20-dione 21-acetate (II), for which the trivial name "$\Delta^1$-desoxycorticosterone acetate" is suggested.




$\Delta^1$-3-Ketoetio*allo*cholenic acid (I), obtained by saponification of the corresponding methyl ester[2], was converted to the acid chloride by the oxalyl chloride method[3] and thence with diazomethane to the crystalline $\Delta^1$-diazoprogesterone (m. p. 183–185° with gas evolution). Decomposition of the latter in boiling acetic acid solution gave a 50% overall yield (based on the acid I) of $\Delta^1$-desoxycorticosterone acetate (II), m. p. 215–217°, $[\alpha]_D^{26} = +139°$ (chloroform), (Anal. Calcd. for $C_{23}H_{32}O_4$: C, 74·16; H, 8·66; acetyl, 11·55. Found: C, 74·17; H, 8·64; acetyl, 11·10). The product exhibited an ultra-violet absorption maximum at 229 m$\mu$, log $\varepsilon$ 4·08, typical of $\Delta^1$unsaturated 3-ketosteroids[2], and the $\Delta[M]_D$ value[4] of +69 was in excellent agreement with that observed[5] (+67) for ketones of this class. The diketone II could also be prepared by collidine dehydrobromination of 2-bromo-21-acetoxy-*allo*pregnane-3,20-dione (III) (m. p. 188–190° dec.), which was obtained by brominating 21-acetoxy*allo*pregnane-3,20-dione in glacial acetic acid with pyridine hydrobromide perbromide[6].

$\Delta^1$-Desoxycorticosterone acetate (II) was tested in oil solution for life maintenance in adrenalectomized rats and proved to possess approximately one-fifth the activity of $\Delta^4$-desoxycorticosterone acetate. It is interesting to note that the corresponding saturated derivative was found by Wettstein and Hunziker[4] to be inactive when tested in twenty times the effective dose of $\Delta^4$-desoxycorticosterone acetate. A comparison between the $\Delta^1$-isomers and the natural hormones in the cortical, progestational and androgenic steroid series demonstrates that a shift of the double bond from the 4,5 to the 1,2 positions seems to have the least effect in the cortical hormone series as compared to the gestagens[7] (one-sixteenth the activity of progesterone) and androgens[1] (one-thirteenth the activity of testosterone).

C. Djerassi, C. R. Scholz, and J. H. Leathem

Research Department, Division of Chemistry, Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, New Jersey, and Bureau of Biological Research, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, January 20, 1949.

*Zusammenfassung*

Die Herstellung von $\Delta^1$-Desoxy-corticosteronacetat wird beschrieben. Beim Übergang vom gewöhnlichen Desoxy-corticosteronacetat ($\Delta^4$) zu dieser hinsichtlich der Lage der Doppelbindung isomeren Verbindung tritt ein Abfall der Wirkung im Überlebenstest an adrenalektomierten Ratten auf $^1/_5$ ein.

[1] Ch. Meystre and A. Wettstein, Helv. chim. acta *31*, 1890 (1948). – v. J. Euw and T. Reichstein, ib. *31*, 2076 (1948).

[2] C. Djerassi and C. R. Scholz, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2404 (1947).

[3] A.L. Wilds and C. H. Shunk, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 2427 (1948).

[4] For the calculation of this value, it is necessary to use the rotation of 21-acetoxy*allo*pregnane-3,20-dione. This known compound [see A. Wettstein and F. Hunziker, Helv. chim. acta *23*, 764 (1940) who reported $[\alpha]_D = \pm 115^0 + 2^0$ (chloroform)] was synthesized in this laboratory by the Wilds-Shunk procedure (ref. 3) from 3-ketoetio*allo*cholanic acid and was found to have $[\alpha]_D^{26} = \pm 120^0 + 1^0$ (chloroform).

[5] C. Djerassi, J. Org. Chem. *12*, 823 (1947).

[6] C. Djerassi and C. R. Scholz, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 417 (1948).

[7] See K. Miescher, Recent Progress in Hormone Research (Proceedings of the Laurentian Hormone Conference) *3*, 47 (1948) for a review on the relation between structure and activity of the sex hormones.

[1] See K. Miescher, Recent Progress in Hormone Research (Proceedings of the Laurentian Hormone Conference) *3*, 47 (1948) (or a review on the relation between structure and activity of the sex hormones.

---

## The Injection of Embryonic Microsomes into early Amphibian Embryos[1]

Among the many hypotheses which have been advanced to explain the mode of action of the embryonic organizer is the idea, independently put forward by Dalcq[2] and by Needham[3], that there might be a similarity between the induction of a nervous system and the spreading of a virus infection. As has been noted by one of us (Brachet[4]), if there is anything comparable to a virus in the embryo, we should expect to find it in the form of particles comparable in size and chemical composition to viruses. These criteria describe the so-called microsome fraction of Claude[5], the composition of which has been studied by Claude, Brachet and Jeener[6], Chantrenne[7], and by many others, all of whom found that these granules are composed of ribonucleic acid associated with proteins (including enzymes) and lipids.

In order to test the possible morphogenetic activity of these particles, they were isolated from breis of frog gastrulæ or neurulæ in the following way. Embryos homogenized in ice-cold dilute phosphate buffer were centrifuged for ten minutes at 6,000 × *g* in order to get rid of the yolk, nuclei and pigment granules. The supernatant fluid was then centrifuged for twenty minutes at 18,000 × *g*, and the resultant pellets of granules were suspended in a small volume of dilute

[1] Aided by a grant from the American Philosophical Society.

[2] A. Dalcq, *L'œuf et son dynamisme organisateur* (Albin Michel, Paris 1941), p. 492, 526.

[3] J. Needham, *Biochemistry and Morphogenesis* (Cambridge, 1942), p. 268.

[4] J. Brachet, *Embryologie chimique* (Desoer, Liège 1945).

[5] A. Claude, Biol. Symp. *10*, 111 (1943).

[6] J. Brachet and R. Jeener, Enzymologia, *11*, 196 (1944).

[7] H. Chantrenne, Biochim. et biophys. acta, *1*, 437 (1947): Enzymologia *11*, 213 (1944).

phosphate buffer and injected by means of fine capillary pipettes into the ventral halves of cleaving eggs, of *Rana pipiens*, *Rana fusca* and of axolotl. The operations were usually done on cleavage stages of from four to sixteen cells, and not too great a mortality ensued. Many operated eggs, however, showed abnormalities at gastrulation and had to be discarded. Several hundred eggs were operated in this way, the location and depth of penetration of the injection varying greatly. An equal number of eggs injected with phosphate buffer alone served as controls.

Only a small part of the material collected has thus far been sectioned, and our results still have a preliminary interest only. However, some of the findings have been very constant. For example, in none of the operated embryos did we find double gastrulation, as would have been the case if the ventral half of the egg had been transformed into an organizer. Furthermore, of 139 sectioned embryos, only 5 showed a secondary neural tube, and, since the neural structures were fused with the primary nervous system, it is likely that they resulted from a mechanical disturbance of gastrulation movements. Thus, as regards induction, our results have thus far been negative, but it must be remembered that negative findings in this connection do not rule out the virus hypothesis, since inactivation during isolation of the granules is by no means excluded.

However, the embryos injected with granules showed one distinct and interesting difference as compared with the controls. The cells surrounding the point of injection, which can usually be easily recognized, in most cases show a distinct increase in basophilia, as demonstrated by staining with toluidine blue. The basophilic material can be digested away with solutions of crystalline ribonuclease, and thus is presumably of ribonucleoprotein nature. These basophilic cells can be found in the ectoderm, the mesoderm or the endoderm, according to the localization and depth of injection, and are present in well localized areas, very often showing no signs of cytolysis (the latter, as shown by one of us, BRACHET[1], is also accompanied by an increase in basophilia). In several cases, when embryos which had been injected with granules were fixed in the late yolk-plug stage, they showed a very definite increase in basophilia in part of the ectoderm. There were, however, no signs of induction in these cases. Such results are of some interest, since they show that a localized synthesis of ribonucleic acid in the ectoderm is not of itself sufficient to evoke a neural induction.

On the whole, increased basophilia near the place of injection occurred in 101 cases out of 139 (72·6%), when granules from gastrulæ or young neurulæ had been introduced. The same phenomenon was seen only five times in 62 cases (8%) when plain phosphate buffer was injected. In these five positive cases, the basophilic cells were few in number and showed distinct signs of incipient cytolysis.

These results suggest that the injected particles are capable of inducing a local synthesis of ribonucleic acid, but whether they are self-reproducing units or whether they contain enzymes synthesizing ribonucleic acid cannot be decided on the basis of the present evidence.

J. BRACHET and J. R. SHAVER[2]

Laboratory of Animal Morphology, University of Brussels, and Department of Zoology, University of Pennsylvania, Philadelphia (Pa.) February 12, 1949.

[1] J. BRACHET, C. R. Soc. biol., *140*, 1123 (1946).

[2] Fellow of the Belgian-American Educational Foundation, 1948–9.

*Résumé*

L'injection de granules provenant d'un broyage de gastrulas ou de blastulas de grenouilles dans des œufs segmentés de différentes espèces d'Amphibiens donne, dans les stades ultérieurs, un accroissement de la basophilie dans les cellules voisines de la piqûre. Les rares embryons témoins, injectés avec un tampon au phosphate, qui donnent une réaction analogue sont sur le point de se cytolyser. On n'a pas noté de gastrulations doubles et les quelques tubes neuraux secondaires observés étaient sans doute dus à un traumatisme mécanique.

---

## Beobachtungen an viruskranken Larven von *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabr.

WEISER[1] hat an Larven von *Camptochironomus tentans* aus dem Drecksee bei Plön eine Infektion des Fettkörpers durch Viren beschrieben, die von kokkenartigen Organismen begleitet waren. Im Herbst 1948 machte ich an *Camptochironomus*larven von dem gleichen Fundplatz bei atmungsphysiologischen Studien, über die später berichtet werden wird, einige Beobachtungen, die im Zusammenhang mit WEISERS Untersuchungen von Interesse sind, und daher kurz wiedergegeben seien.

*Camptochironomus*larven zeigen schon aus ihrem natürlichen Medium (fauliger Schlamm mit deutlicher Sauerstoffzehrung) eingebracht, erheblich gesteigerte Erholungsatmung, die langsam beim Schütteln mit Luft im Warburg-Manometer geringere Werte anstrebt. Das am 29. November 1948 eingebrachte Tiermaterial wurde in einer Schale mit Wasser und nur Spuren von Schlamm im Laboratorium aufbewahrt. Namentlich ältere Larven zeigten verschiedentlich den kennzeichnenden weißen, undurchsichtigen Fettkörper kranker Tiere. Sie starben und zerfielen meist bald; das Wasser hatte bald «fauligen» Charakter und dementsprechend sicher nur geringen Sauerstoffgehalt. Das war mir erwünscht, da ich ja Beobachtungen an Larven in Erholungsatmung anstellen wollte. Die Folge dieser wenig pfleglichen Aufbewahrung des Materials war jedoch auch, daß bald die Mehrzahl der Larven, auch jüngere, nur etwa halberwachsene Tiere, deutliche Krankheitserscheinungen zeigten.

Während früher (z. T. auch später) die Erholungsatmung der Larven durchaus normalen Verlauf zeigte, ergaben einige Messungen am 8., 9. und 10. Dezember 1948 ein sehr merkwürdiges Bild der Gestaltung der Erholungsatmung: sie setzte mit normal hohem Wert ein, sank aber dann (bei halbstündigen Messungsetappen) sehr rasch zu außerordentlich niedrigen, kaum noch von lebenden Tieren zu erwartenden Werten ab. 3 Protokolle (I–III) mögen dies belegen, während die Messung IV das Verhalten nicht infizierter Tiere vom 10. Dezem-

| Etappe | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 279,9 | 249,5 | 235,4 | 276 |
| 2 | 176,7 | 65,6 | 157 | 258,5 |
| 3 | 107,7 | 78,7 | 55 | 233,3 |
| 4 | 81,5 | 25,21 | 43,2 | 233,3 |
| 5 | 45,68 | – | – | 241,5 |

[1] J. WEISER, Exper. *4*, 317 (1948).

ber 1948 zeigt. Die gegebenen Zahlen bedeuten den Sauerstoffverbrauch in $mm^3$ pro 1 g Frischgewicht und eine halbe Stunde.

Die Larven der Messungen I–III waren bei Messungsende (also nach 2 bis 2½ Stunden Schüttelns mit Luft) tot; wie mikroskopische Prüfung zeigte, war ihre Hämolymphe trüb, reich an körnigem Material und die Organe des Innern, insbesondere der Fettkörper, in Zerfall begriffen.

Zu diesen Messungen waren – entsprechend dem Plan meiner atmungsphysiologischen Untersuchungen – stets Parallelversuche unter dem Einfluß narkotischer Gifte (Äthylurethan 0,5%, auch Alkohol 9,6% oder Chloralhydrat 0,1%) durchgeführt worden. Unter dem Einfluß dieser Gifte wurden auch an kranken Tieren stets nur geringe Atmungsgrößen (70–90 $mm^3$ pro 1 g und eine halbe Stunde) beobachtet, die aber im Verlauf der Messung konstant blieben, eher zu leichter Vergrößerung neigten. Bei Messungsende waren die narkotisierten Larven im Gegensatz zu den in Leitungswasser gemessenen am Leben; sie erholten sich, in reines Wasser überführt, bald vollkommen und lebten wenigstens eine Woche ungeschädigt weiter.

Ebenso blieben Larven, die statt mit Luft mit einem Gasgemisch niederen Sauerstoffpartialdrucks (ca. 1%) geschüttelt wurden, bei geringer Atmungsgröße am Leben und zeigten keinerlei Zerfallserscheinungen.

Das Ergebnis der vorstehenden Beobachtung ist also, daß eine Krankheit (vorwiegend wohl Virusinfektion) der Larven von *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans*, die normalerweise, d. h. beim Leben in Medien mit geringem Sauerstoffpartialdruck schleichend verläuft und (nach Weiser) erst bei der Verpuppung zum Tode führt, bei optimaler Versorgung mit Sauerstoff (schon vom Partialdruck der Luft) akut wird und in kurzer Zeit (ca. 1 Stunde) das Leben der Larve beendet.

Hieran sei noch eine ökologische Spekulation angeknüpft. *Camptochironomus tentans* ist – wenigstens in Ostholstein – eine Charakterform vergreister Seen mit stark faulendem Schlamm (z. B. Drecksee bei Plön, Tröndelsee bei Elmschenhagen). Wenn die Art mit ihrer offensichtlich starken Anfälligkeit für die beobachtete Infektion Gewässer mit wenigstens zeitweilig günstiger Sauerstoffversorgung besiedeln würde, so wäre infolge zahlreicher zerfallender Krankheitsträger die Gefahr einer Epidemie gegeben und damit der Bestand der Art im Biotop bedroht. Vielleicht ist hierin ein Grund für die ökologische Beschränkung der Art auf vergreiste Seen zu erblicken.

Vielleicht ist die beobachtete Hemmung von Viruskrankheiten durch narkotische Gifte von klinischer Bedeutung.

O. Harnisch

Hydrobiologische Anstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Plön, den 10. Januar 1949.

*Summary*

A virus infection of the larvæ of *Chironomus tentans* elapses slowly under normal conditions (low $O_2$-partial pressure). If the partial pressure is about 21%, the infection becomes acute and kills the animals within a short time (about one hour). Narcotics (especially æthylurethan) prevents this process diminishing the oxygen consumption.

## The Origin of Moss Gametophytes in Cultures without Access of Light

In the numerous experiments with moss-cultures without access of light which have been carried out up till now (Servettaz, Goebel, Ubisch, Robins, Pringsheim, Fries, etc.), the mosses either did not grow at all (*Leptobryum*) or formed only protonemata. This fact led to the conclusion that for the origin of the gametophyte light is indispensable. Thus Pringsheim: "Niemals kamen die Kulturen über das Protonemastadium hinaus. Zur Bildung von Moospflanzen ist Licht erforderlich; doch muß es nicht gemischtes 'weißes' Licht sein, es genügt rotes."

When we prevent light from reaching whole already developed moss plants of some species, these continue to grow strongly etiolized for some time (Němec). But in the species with which experiments were made, gametophytes did not develop from the protonemata, either in cultures with glucose or with other organic substances.

I arrived at very different results in my experiments with the species *Splachnum sphæricum* L. fil., *Splachnum ampullaceum* L., and *Trematodon ambiguus* Hornsch. On mineral media with saccharose (2%) in the dark gametophytes formed very abundantly. For the cultures I used either agar media or a solution in which the mosses grew submerged. In both cases gametophytes were formed. On agar media first the protonemata grew, and gradually the gametophytes formed on them. The cauloids were of normal thickness, but the phylloids were squamous and farther apart from each other than in normal plants. Chlorophyll was lacking in most cases. But in *Splachnum ampullaceum* L. on an agar medium the plants grew normally green. The protonemata were without chlorophyll, in some cases they turned brown after a longer time.

From the experiments with a greater number of species (about 100), which are now being carried out in the Institute for Plant Physiology under the direction of Prof. Dr. S. Prát (V. Klečková: Assimilation of organic nitrogen; J. Votýpková:— Cultivation of mosses on media with different sugars), one may infer that for the origin of the gametophytes suitable nutritive substances are primarily necessary.

This work has been accomplished with the assistance of the Czechoslovak Research Council.

M. Keil

Institute for Plant Physiology of the Charles University, January 10, 1949.

*Zusammenfassung*

Die bisherigen Untersuchungen über Wachstum der Moose in Dunkelkulturen ergaben, daß die Moose ohne Lichtzutritt nur Protonema zu bilden fähig sind. Neue Versuche, über die berichtet wird, mit der Kultur der Moose, *Splachnum sphaericum* L. fil., *Splachnum ampullaceum* L. und *Trematodon ambiguus* Hornsch, hatten ein entgegengesetztes Resultat. Die genannten Moose bildeten in Dunkelkulturen auf festem Agarnährboden wie auch in flüssigem Medium mit Saccharosezusatz Gametophyten. Die unter diesen Bedingungen gebildeten Gametophyten waren chlorophyllfrei und die Phylloide waren schuppenförmig. Aus diesen und anderen jetzt durchgeführten Versuchen ist zu schliessen, daß nicht das Licht, sondern die Nährstoffart und der Nährstoffvorrat für die Gametophytenentstehung bestimmend ist.

## Cardiac Glucosides and Lundsgaard Contracture

The striped muscle of vertebrates poisoned with monohalogeno acetate shows *when stimulated* a progressive, irreversible contracture and inexcitability. This contracture, the Lundsgaard phenomenon, is associated with the inhibition of carbohydrate metabolism. All the substances which react with the –SH groups of cysteine, glutathione, and proteins (i. e. "*thioloprive*" substances[1]), when applied to isolated amphibian muscle, give the same contracture curve when the muscle is stimulated: for instance, heavy metal ions, arsenic compounds[2], vesicants and lacrymators, maleic acid (but not fumaric) and oxidizing substances including quinones and peroxides.

Further work has shown that the Lundsgaard contracture is the physiological translation of any biochemical lesion of carbohydrate metabolism[3].

At first sight, nothing is closer to the Lundsgaard phenomenon than the contracture of the frog's heart poisoned with a cardiac glucoside, and this similarity is not accidental[1].

A series of papers of KRAYER, R. MENDEZ, and others[4] have shown the following facts:– (1) substances (synthetic or natural) containing the unsaturated lactone ring, which in the molecule of cardiac glucosides is essential for digitalis-like action, cause a progressive ventricular contracture of the isolated frog's heart; (2) ascorbic acid, which can be considered as an unsaturated lactone, has a digitalis-like action on the frog's heart, and this action is due to hydrogen peroxide formed during the oxidation of ascorbic acid; (3) besides $H_2O_2$ (a confirmation of RICHTER's[5] observations), various sulfhydryl reagents applied to the frog's heart lead to progressive contracture and inexcitability.

Recent work in my laboratory has proved that isolated amphibian striped muscle, when poisoned with digitoxin, shows an incomplete contracture when periodically excited with KCl; but we have not observed a reaction *in vitro* between cardiac glucosides and sulfhydryl substances in an atmosphere of nitrogen.

Many substances have the same general effect (with quantitative differences) on striped and cardiac muscle; the digitalis ventricular contraction of the frog's heart may be considered as a particular case of the Lundsgaard contracture. The biochemical background of the Lundsgaard contracture is an inhibition of glycolysis by blocking of the SH enzymes; lactic acid is not produced; the phosphagen stores are rapidly exhausted.

Several investigations by various german authors show that cardiac glucosides inhibit glycolysis *in vitro*:– (1) strophanthin 0·001 to 0·1% decreases oxygen consumption and $CO_2$ production of mouse liver and guinea-pig's brain; anaerobic glycolysis is inhibited by strophanthin concentration as low as 0·001%[6]; (2) according to HAARMANN[7] and TOBBEN[8], lactic acid formation in hearts poisoned with strophanthin is nearly completely inhibited, although it might be increased when small concentrations of strophanthin are used. Further discussion of these facts is given by LENDLE[1]. In this field of biochemical action of cardiac glucosides, much more information is needed before reaching a definite conclusion; all that can be said at present is that already a few data are available by favour of the hypothesis which assimilates cardiac glucoside contracture to the Lundsgaard phenomenon on striped muscle.

Quite naturally, many arguments can be raised against this idea; conflicting observations are numerous. We agree with MENDEZ[2] when he stresses the point that therapeutic and toxic actions are very different phenomena in digitalis action; but we like to give a final clinical argument.

The typical disease where inhibition of carbohydrate metabolism (at the level of pyruvic acid) plays the dominant role is beriberi. Sudden death from cardiac failure and vasomotor collapse is common in human severe thiamin deficiency; it is usual in criminal digitalis intoxications. The T wave of the electrocardiogram is typically flattened or inverted in beriberi and in digitalis poisoning; this anomaly disappears when both conditions are cured; failure of the beriberi heart to respond to digitalis therapy has been noted, and considered as a criterium[3].

Thus, if one considers the pharmacological evidence, the clinical data and the little we know about the biochemical action of cardiac glucosides, one gathers without difficulty the elements of a sound working hypothesis which may be formulated as follows: the action of cardiac glucosides on the heart is the consequence of a discrete inhibition of carbohydrate metabolism, presumably by the indirect blocking of some –SH enzyme (or enzymes).

Z. M. BACQ

Laboratoire de pathologie et thérapeutique générales, Université de Liège, Belgique, le 8 janvier 1949.

*Résumé*

De nombreux arguments d'ordre pharmacologique, en accord avec quelques expériences biochimiques et des observations cliniques, montrent que la contracture cardiaque provoquée par les corps digitaliques peut-être assimilée à la contracture de Lundsgaard du muscle strié. Une hypothèse de travail est proposée, selon laquelle l'action des glucosides digitaliques sur le cœur est la conséquence d'une inhibition partielle du métabolisme des hydrates de carbone.

[1] Z. M. BACQ, Exper. *2*, 349, 385 (1946).

[2] J. M. GERNAY and J. LECOMTE, Arch. Int. Pharm. Thér., *77*, 318 (1948).

[3] J. LECOMTE, M. GOFFART, and Z. M. BACQ, Arch. Int. Physiol., *51*, 63 (1948).

[4] O. KRAYER, R. MENDEZ, E. MOISSET DE ESPANES, and R. P. LINDSTEAD, J. Pharm. Exper. Ther., *74*, 372 (1942). – O. KRAYER, R. P. LINDSTEAD, and D. TODD, ibid., *77*, 113 (1943). – R. MENDEZ, ibid. *81*, 151 (1944). – R. P. LINDSTEAD and O. KRAYER, Science *95*, 332 (1942).

[5] H. RICHTER, Arch. Exper. Path. Pharmak. *197*, 137 (1941).

[6] H. WEESE and CH. WIEGAND, Medizin and Chemie *2*, 148 (I. G. Farben, 1934).

[7] W. HAARMANN, Bioch. Z. *255*, 103, 142 (1932).

[8] H. TOBBEN, *Thesis* (Münster 1932).

[1] L. LENDLE, Heffter Handbuch Exper. Pharm., Ergänzungswerk *1*, 207 (1935).

[2] R. MENDEZ, Archives Inst. Card. Mexico *17*, 83 (1947).

[3] E. S. GORDON, *Nutritional and Vitamin Therapy* (The Yearbook Publishers, Chicago, 1947).

---

## Protecting Effect of Heparin on the Oxidation of Thrombin[1]

There can be found many statements in the widespread literature on heparin about its antithrombin–antiprothrombin–and antikinase effect.

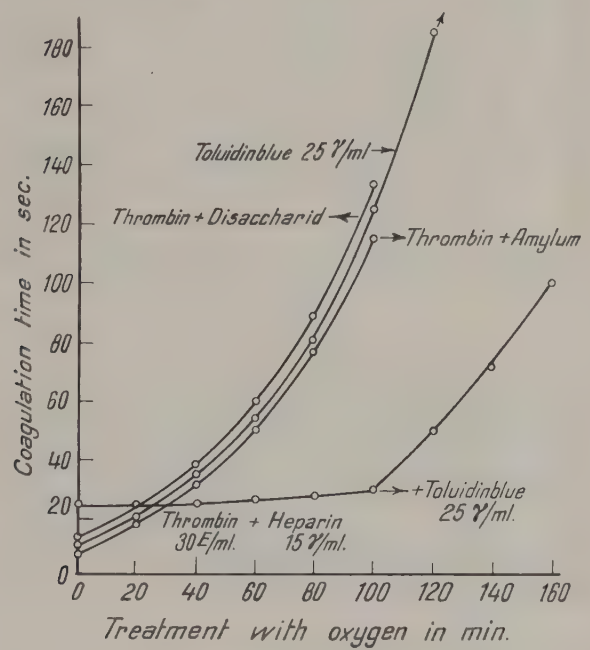
[1] With the help of the «Roche»-Studienstiftung.

The present work demonstrates a property of heparin, unknown till now, from which one could conclude–under certain circumstances–on a thrombin-protecting effect of the heparin.

In a previous work[1] it was reported, that thrombin is oxidizable and that it loses its coagulation activity in this oxidized form. In the actual work the oxidation of thrombin could be reached by streaming it through with molecular oxygen, as our starting material (thrombin, Hoffmann - La Roche) contains some unknown compound which activates molecular oxygen. This proceeding can be shown in a typical curve (see Figure). It is evident from this curve that thrombin loses its activity to coagulate plasma (0·2% sodium oxalate) or fibrinogen (0·6%) gradually and finally gets inactive totally, when it is streamed through with oxygen.

If heparin up to a concentration of 15 $\gamma$/ml is added to a solution of thrombin the coagulation time against plasma increases from 10 to 26 seconds. When, on the other hand, the same heparin thrombin mixture and the solution of thrombin whithout heparin are streamed through with oxygen at the same time, so the heparin-free solution of thrombin only loses its coagulation activity, meanwhile the mixture of thrombin and heparin keeps its original coagulation activity completely.

Therefore heparin protects the thrombin from oxidation by oxygen.




As the heparin is an esterified polysaccharide (Liquemin, Hoffmann-La Roche ester of polysulfuric acid of mucoitin), the experiment was repeated with other non-esterified saccharides. It was shown that neither disaccharides nor the polysaccharide starch has the oxidation-inhibiting quality of heparin.

The specific activity of heparin is proved by the fact that, if the heparin in the mixture of thrombin and heparin is combined with toluidine blue (25 $\gamma$/ml) the activity of heparin is excluded and an oxidation resp. inactivation of thrombin takes place (see Figure).

[1] L. A. Pálos, Nature, in print.

Experiments on the behaviour of heparin during oxidation of the plasma and the other coagulation factors, are in process.

The acting mechanism of heparin in this reaction is not known and should be further investigated.

L. A. Pálos

Institute for Hygiene and Bacteriology of the University of Basle, Switzerland, December 30, 1948.

*Zusammenfassung*

Das Thrombin ist oxydierbar und wird in seiner oxydierten Form inaktiv. Die Oxydation des Thrombins kann durch sehr kleine Mengen Heparin gehemmt werden. Wenn das Heparin mit Toluidinblau gebunden wird, kann die Oxydation vor sich gehen.

## Effect of Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, and Nicotinic Acid on the Intestinal Absorption of Dextrose

In earlier experiments[1] I found that after the administration of unphysiologically large doses of a vitamin used in the metabolism in phosphorylated form, the apparatus of the phosphorylation becomes exhausted. I further found[2] that the absorption of one vitamin—in my experiments that of thiamin—from the intestine was greatly impaired, when other vitamins of the B complex were given in large doses before the experiment. This fact could also be demonstrated by using dextrose instead of the vitamins. So I could explain the cases of the so-called vitamin imbalance, i. e. the deficiency symptoms which became manifest in a deficiency state during the treatment with large doses of a single vitamin, symptoms of pellagra, for instance, after administration of riboflavin, or symptoms of polyneuritis during the treatment with nicotinic acid. The high unphysiological dosis of a vitamin gives rise to the exhaustion of the phosphorylation apparatus and other vitamins cannot be utilized.

To get further evidences of my hypothesis, I examined the absorption of dextrose–a substance which must be phosphorylated too when absorbed and utilized–from the intestine of rats, after having administered large doses of the B-complex vitamins.

My method was that of Laszt's procedure[3] in which 200 mg of dextrose in 2 cc phys. sodium chloride solution were given into a 30 cm long tied bowel section of narcotized rats and after 30 minutes the unabsorbed quantity of the dextrose was determined. Details of the method are given elsewhere[2].

The results of the control experiments were the following:

*Table I*

| No. | mg dextrose found after 30 min. | mg dextrose absorbed | absorbed dextrose % |
|---|---|---|---|
| 1 | 120 | 80 | 40 |
| 2 | 137 | 63 | 31 |
| 3 | 112 | 88 | 44 |
| 4 | 121 | 79 | 38 |
| 5 | 109 | 91 | 45 |
| 6 | 124 | 76 | 38 |

[1] I. Magyar, Acta medica Hungarica *1*, 46 (1948).
[2] I. Magyar, Int. Z. Vitaminforsch., in print.
[3] L. Laszt and L. dalla Torre, Schweiz. med. Wschr. *22*, 1416 (1941).

In further experiments, 60 minutes before the administration of dextrose into the bowel the animals were given subcutaneously 50 mg of thiamin, 5 mg of riboflavin, 25 mg of pyridoxin and 100 mg of nicotinamide respectively.

*Table II*

| No. | Vitamin given before | mg dextrose found after 30 min. | mg dextrose absorbed | absorbed dextrose % |
|---|---|---|---|---|
| 1 | thiamin | 178 | 22 | 11 |
| 2 | ,, | 187 | 13 | 6 |
| 3 | ,, | 180 | 20 | 10 |
| 4 | ,, | 189 | 11 | 5 |
| 5 | ,, | 174 | 26 | 13 |
| 6 | riboflavin | 196 | 4 | 2 |
| 7 | ,, | 189 | 11 | 5 |
| 8 | ,, | 200 | — | — |
| 9 | nicotinamide | 187 | 13 | 6 |
| 10 | ,, | 200 | — | — |
| 11 | ,, | 192 | 8 | 4 |
| 12 | pyridoxin | 174 | 26 | 13 |
| 13 | ,, | 178 | 22 | 11 |
| 14 | ,, | 196 | 4 | 2 |

It can be seen from the tables that *vitamins of the B complex (thiamin, riboflavin, nicotinic acid and pyridoxin) decrease the absorption rate of sugar from the bowel.*

According to my view, this effect depends on the exhaustion of the phosphorylation—may be on the exhaustion of the enzyme phosphorylase—if large doses of the vitamins are given, whereby dextrose, needing also phosphorylation, becomes incompletely absorbed and used.

Imre Magyar

First Medical Clinic of the University of Budapest, July 30, 1948.

*Zusammenfassung*

Die Vitamine des B-Komplexes vermindern die Zuckerresorption im Darm. Durch die Phosphorylierung von Thiamin, Riboflavin, Nikotinsäure und Pyridoxin wird – wahrscheinlich – die Phosphorylase erschöpft. Dextrose, die phosphoryliert werden muß, kann dann nur in kleinerer Menge resorbiert und verbraucht werden.

## Inhibitory Effect of Simultaneous Administration of Antasten and Tween 20 on Gastric Secretion Induced by Histamine or Vagal Stimulation

Ivy *et. al.*[1] have recently shown that the wetting agent Tween 20 which is a polyoxylene derivate of sorbitan monolaurate, produces urticaria when given intravenously in dogs. Grossman and Robertson[2] then found that the urticaria is accompanied by gastric secretion which they were able to prevent or reduce by pre-treatment with Benadryl ($\beta$-dimethylaminoethyl benzhydryl ether hydrochloride) Inasmuch as Benadryl does not inhibit histamine-stimulated gastric secretion, they thought that the mode of action of Benadryl on secretion stimulated by Tween 20 must involve another mechanism. They stated that if histamine is released when Tween 20 is administered, Benadryl must block its formation and not its action on the gastric glands.

[1] A. C. Ivy, C. A. Tanturi, R. Hernandez, and E. Baroso, Arch. Derm., in press.

[2] M. I. Grossman and C. R. Robertson, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. *68*, 550 (1948).

Anyhow, one can conceive another explanation, namely that the condition (permeability ?) of the gastric secreting cells is altered by the action of Tween 20, and then Benadryl is capable of blocking the histamine effect within the gastric glandular cells. Starting from this assumption the author made some experiments on anæsthetized dogs with pouches of the entire stomach. Tween 20 was administrated intravenously by continuous injection at a rate of about 1 mg/kg/hr. After about 20–30 minutes the gastric secretion started, reached a maximum, but then disappeared in about one hour. Without stopping the administration of Tween, histamine was then given intravenously by continuous injection. When the gastric secretion rate reached a steady state, 0·1 g of Antasten (2 *N* phenylbenzylaminomethyl imidazoline) was given intravenously in massive dose. In all experiments the secretion immediately decreased to 35–50 p.c. of the steady state value. In about 30 minutes the secretion rate again rose to the preceeding value. A second injection of Antasten gave the same effect.

To throw light upon the role of the histamine as a normal gastric secretagogue, experiments were made in which gastric secretion was induced by electrical stimulation of the vagi in the neck *ad modum* Vineberg[1]. When simultaneously with the nerval stimulation Tween was injected as above, Antasten almost completely blocked the gastric secretion. In about 30 minutes the secretion returned to the preceeding value. The experiments indicate, that the acidity is much more influenced than the peptic activity. Without Tween no inhibition by Antasten was achieved neither in histamine—nor in vagus—stimulated gastric secretion. On cats, attempts in producing gastric secretion by Tween 20 or blocking the histamine-induced secretion by Antasten during Tween-administration have been unsuccessful so far.

Sven Linde

Institute of Physiology, University of Uppsala, Sweden, March 5, 1949.

*Zusammenfassung*

Nach Vorbehandlung mit dem benetzenden Mittel Tween 20 gelang es, sowohl die durch Histaminwirkung als auch durch Vagusreizung erzeugte Magensaftsekretion mit dem Antihistaminpräparat Antasten zu hemmen. Ohne Vorbehandlung mit Tween 20 wird keine Hemmung durch das Antihistaminpräparat hervorgerufen. Es ist möglich, daß Tween 20 die Permeabilitätsverhältnisse in den magensaftsezernierenden Zellen verändert, so daß Antasten die Histaminwirkung in den Zellen selbst blockieren kann.

[1] A. M. Vineberg, Amer. J. Physiol. *96*, 363 (1931).

## Sur un comportement singulier de la L(—)-phénylalanine en présence d'extraits testiculaires

On oppose depuis Krebs[1] les D-acidaminodéhydrases largement répandues, faciles à extraire des tissus à l'aide des solutions salines, aux L-acidaminodéhydrases moins actives et d'extraction beaucoup plus malaisée[2].

[1] H. Krebs, Z. physiol. Chem. *217*, 191 (1933).

[2] M. Polonovski et P. Boulanger, Bull. Soc. Chim. Biol. *20* 1298 (1938).

Green, Blanchard, Nocito et Ratner[1] isolèrent du rein un enzyme désaminant électivement 14 aminoacides naturels, dont la L-phénylalanine, après avoir inhibé la D-acidaminodéhydrase. Mais le tissu rénal lui-même manifeste toujours primitivement une activité désaminante beaucoup plus marquée envers les D-aminoacides qu'envers leurs énantiomorphes naturels.

Dans le cas particulier de la L(—)-phénylalanine, l'oxydation enzymatique a fait l'objet des recherches de Lang et Wesphal[2] qui montrèrent son utilisation spécifique par le foie sans libération d'ammoniac, Bernheim et Bernheim[3] ont étudié sa transformation en L-tyrosine. De leur côté, Edlbacher et Grauer[4] ont reconnu l'existence, dans le foie, d'un système enzymatique spécifique de la L-phénylalanine, distinct de la L-acidaminodéhydrase, de par sa sensibilité à différents inhibiteurs. Mais jamais on n'avait reconnu à un organe la faculté de dégrader plus électivement la phénylalanine naturelle.

Un test olfactif nous avait permis de déceler la transformation de la phényléthylamine en phénylacétaldéhyde par l'odeur reconnaissable d'essence de jasmin, et ainsi permis de caractériser l'amine oxydase[5] dans la plupart des tissus; le caractère ubiquitaire de cette diastase avait échappé à des tests moins sensibles[6]. Or, une légère odeur d'essence de jasmin se développe, lorsqu'on met en présence des extraits salins de certains organes, la L(—)-phénylalanine.

Etant donné le caractère trop subjectif de ce test et son aspect purement qualitatif, nous avons cherché à déceler et à doser les composés carbonyles, phénylacétaldéhyde et acide phénylpyruvique éventuellement formés, par leurs dinitrophénylhydrazones dont les solutions en milieu alcalin se prêtent à un dosage photométrique. Les résultats sont conventionnellement exprimés en densité optique pour une longueur d'onde de 4500 Å. On constate que, dans le cas du foie et du rein, les composés carbonyles sont plus abondants lorsque le substrat est la D(+)-phénylalanine, ce qui est conforme aux données classiques. Dans le cas de la rate, du muscle, de la surrénale, l'activité enzymatique n'est pas mesurable par cette technique quel que soit l'isomère optique en cause; au contraire, les extraits de testicules de cobaye et de lapin sont nettement plus actifs vis-à-vis du dérivé naturel L.

| Organes | L(–)-phényl-alanine | D(+)-phényl-alanine | DL-phényl-alanine |
|---|---|---|---|
| Foie (cobaye) . . . . . | 0,05 | 0,029 | 0,12 |
| Rein (cobaye) . . . . | 0 | 0,51 | 0,35 |
| Testicule (cobaye) . . . | 0,52 | 0,07 | 0,41 |
| Testicule (lapin) . . . | 0,58 | 0,08 | 0,48 |

Cette action particulière des extraits testiculaires ne pouvait être interprétée, selon le modèle de Holtz[7] par l'existence hypothétique d'une L-phénylalanine-décarboxylase, et l'action secondaire d'une amine-oxydase transformant la phényléthylamine, intermédiairement apparue, en phénylacétaldéhyde. A cette explication s'opposent, en effet, l'absence de toute trace de phényléthylamine dans les produits de la réaction enzymatique, ainsi que les quantités insignifiantes de phénylacétaldéhyde isolables sous forme de dinitrophénylhydrazone.

L'absence de quantités notables de phénylacétaldéhyde permet d'éliminer aussi l'hypothèse d'un processus oxydatif direct au niveau du carbone de la phénylalanine, avec libération simultanée de $NH_3$ et $CO_2$.

Force était donc d'envisager comme seule hypothèse vraisemblable un processus de désamination oxydative par une L-phénylalanine-déshydrogénase, qui se trouverait particulièrement extractible par les solutions salines, à l'inverse, dans ce cas particulier, de la D-phénylalanine-déshydrogénase. Cette hypothèse s'est trouvée confirmée du fait que nous avons pu mettre en évidence, au cours de la réaction, la formation d'acide phénylpyruvique, en isolant sa p-dinitrophénylhydrazone par une technique inspirée de la méthode chromatographique de Strain[1]: la chromatographie sur talc des dinitrophénylhydrazones brutes, préparées par action de la 2–4-dinitro-phénylhydrazine sur le produit de la réaction enzymatique après défécation métaphosphorique, nous a permis, en effet, de séparer des hydrazones brutes une hydrazone identique à celle de l'acide phénylpyruvique préparé par synthèse. La p-dinitrophénylhydrazone de la phénylacétaldéhyde n'a pu être isolée qu'en quantités minimes et les traces d'aldéhyde responsables de l'odeur de jasmin, s'expliquent probablement par une décarboxylation secondaire très partielle de l'acide phénylpyruvique.

Ainsi les extraits testiculaires en solution saline contiennent un système enzymatique susceptible de transformer la L(—)-phénylalanine en acide phénylpyruvique plus activement qu'il ne transforme la D(+)-phénylalanine.

M. Polonovski et G. Schapira

Laboratoire de biochimie médicale de la Faculté de médecine, Paris, le 10 janvier 1949.

*Zusammenfassung*

Hodenextrakte, die mit Salzlösungen erhalten werden, enthalten ein enzymatisches System, das imstande ist, L(–)-Phenylalanin erheblich schneller als D(+)-Phenylalanin durch oxydative Desaminierung in Phenylbrenztraubensäure umzuwandeln.

[1] H. H. Strain, J. Amer. Chem. Soc. *57*, 758 (1937).

[1] M. Blanchard, D. E. Green, V. Nocito et S. Ratner, J. Biol. Chem. *155*, 421 (1944). – D. E. Green, D. H. Moore, V. Nocito et S. Ratner, J. Biol. Chem. *156*, 383 (1944).

[2] K. Lang et U. Wesphal, Z. physiol. Chem. *276*, 179 (1942).

[3] F. Bernheim et M. L. C. Bernheim, J. Biol. Chem. *152*, 481 (1944).

[4] E. S. Edlbacher et H. Grauer, Helv. chim. acta *27*, 153, 928 (1944).

[5] G. Florence et G. Schapira, C. R. Soc. Biol. *139*, 35 (1945).

[6] G. Schapira, C. R. Soc. Biol. *139*, 36 (1945).

[7] P. Holtz, Z. physiol. Chem. *273*, 201 (1942).

## The Influence of Polar Solvents on the Metachromatic Reaction *in vitro*

The specificity of the metachromatic colour reaction in various tissue elements stained with certain basic aniline dyes is still a matter of discussion. With the methods yet published it is not possible to differentiate the various chromotrope substances in connective tissue.

The well-known effect of polar solvents on macromolecular systems suggests that they may alter the bond between the chromotrope substance and the basic dye. Furthermore, there is the possibility that, using the same polar solvent, the annulment of the metachromatic reaction between the chromotrope substances and

the dye occurs at a concentration of the solvent characteristic of the respective substance.

It would be of general interest to investigate whether the effect of various polar solvents on the metachromatic reaction of a chemically defined chromotrope substance could be correlated with any known physicochemical properties of the solvent.

In order to test these hypotheses the following experiments were devised:—

*Chromotrope substance:*– Water solutions of the sodium salts of chondroitin sulfuric acid[1], hyaluronic acid[1], and heparin were used. Each solution had a concentration of 200 mg p. 100 ml. The heparin used had a strength of 80 Toronto units per mg substance.

*Dye*:—Toluidine blue 0·4 mg p. 100 ml in water.

Serial dilutions of the chromotrope substances with concentrations ranging from 200 mg p. 100 ml to 12.5 mg p. 100 ml were made. To one ml of each dilution of the different substances was added 9 ml of the solution of the stain.

A purple, metachromatic colour reaction took place in all the concentrations of the chromotrope substances. In no case was there any precipitation.

The following solvents were then added to these test solutions: dioxan, ethanol, methanol, isopropyl alcohol, and acetone until the purple colour completely disappeared and changed to a blue as compared to a standard solution of toluidine blue in water (9 ml dye solution, 0.4 mg p. 100 ml and one ml water).

*Results*:—With this very crude method it was found that the required amount of the same solvent was relatively constant for the same chromotrope substance, despite the varying concentrations of the latter. However, different amounts of a certain solvent were required by the three different chromotrope substances (see Tables I and II).

Experimental data from a typical experiment given thus would seem to imply that the amount of each polar solvent required to annul the metachromatic reaction between the dye and the various chromotrope substances is not the same. Furthermore, the calculated dielectric increments given in the Table II suggest the possibility that *the dielectric change required to alter the metachromatic bond is of the same order of magnitude for a specific substance.*

Spectrophotometric analyses and measurements of dielectric constants in relation to the phenomenon described above, as well as staining experiments on tissue sections, are in progress.

T. Edlund and B. H. Persson

Institute of Physiology and Institute of Histology, University of Uppsala (Sweden), December 10, 1948.

*Table I*

Dielectric increments of polar solvents used (for 1 molar, aqueous solutions). According to the literature.

| Solvent | Dielectric increment |
|---|---|
| Dioxan | −8·3 |
| Ethanol | −2·6 |
| Methanol | −1·4 |
| Isopropyl alcohol | −4·3 |
| Acetone | −3·2 |

*Table II*

Dielectric increment required to annul the metachromatic reaction. Calculated from the concentration of the solvents in the test solution.

| Chromotrope substance Sodium salts of: | Dioxan | Ethanol | Methanol | Isopropyl alcohol | Acetone |
|---|---|---|---|---|---|
| Chondroitin sulphuric acid | −13·7 | −10·6 | − 8·9 | −10·8 | − 9·0 |
| Hyaluronic acid | − 8·3 | − 7·8 | − 7·9 | − 8·6 | − 7·7 |
| Heparin | −24·2 | −20·1 | −18·0 | −18·8 | −20·0 |

[1] Obtained by courtesy of Prof. G. Blix, Institute of Medical Chemistry, Uppsala.

*Zusammenfassung*

Gewisse basische Anilinfarbstoffe geben im Bindegewebe eine metachromatische Farbreaktion, welche jedoch die verschiedenen chromotropen Substanzen nicht differenziert zur Darstellung bringt. Die Vermutung, daß polare Lösungsmittel die Bindung zwischen basischem Farbstoff und chromotroper Substanz verändern und daß die Aufhebung der Farbreaktion für verschiedene Substanzen bei verschiedenen charakteristischen Lösungsmittelkonzentrationen erfolgt, wird *in vitro* an Serienverdünnungen mit Toluidinblau geprüft. Die purpurrote Farbe konnte mit polaren Lösungsmitteln ausgelöscht werden. Die zur Auslöschung benötigte Menge des Lösungsmittels ist für verschiedene chromotrope Substanzen charakteristisch und die damit verbundene dielektrische Änderung ist für eine spezifische Substanz von gleichbleibender Größenordnung.

## The Thyroxine Sensitivity of Normal and Thyroidectomized Rats

Though several investigators mention that thyroidectomized animals are more sensitive to thyroxine than normal ones, only very few quantitative data are available. Meyer and Wertz[1] administered thyroxine to normal and thyroidectomized rats during three days, measured $O_2$-consumption on the fifth day, and found that the latter rats are 25–30 times as sensitive as the former. Repeated doses of thyroxine are known to be more effective than the same amount administered in a single dose[2], and therefore these data could not be valid for the relative effectiveness of single doses. The minimal effective dose of thyroxine in thyroidectomized animals has apparently not been established and was therefore investigated.

Methods:—Male rats of approximately 250 g bodyweight and well accustomed to the determination of $O_2$-consumption were used. $O_2$-consumption was estimated before and 24 hours after the subcutaneous administration of thyroxine (Schering) in the somewhat modified apparatus of Belák and Illényi[3].

The $O_2$-consumption of the thyroidectomized animals was 30–40 p. c. below normal before the administration of thyroxine, while that of the controls was within normal limits.

Fig. 1 demonstrates that subcutaneous injection of 2 µg are followed after 24 hours by a marked rise of $O_2$-

[1] A. E. Meyer and A. Wertz, Endocrinol. *24*, 683 (1939) cit. Ber. Physiol. *114*, 458.

[2] E. Le Breton and G. Schaeffer, C.R. Soc. Biol. *118*, 445 (1935).

[3] K. Belák and A. Illényi, Biochem. Z. *281*, 27 (1935).

consumption in the thyroidectomized rat, while even 1 mg has no effect on the normal animal. Neither was a

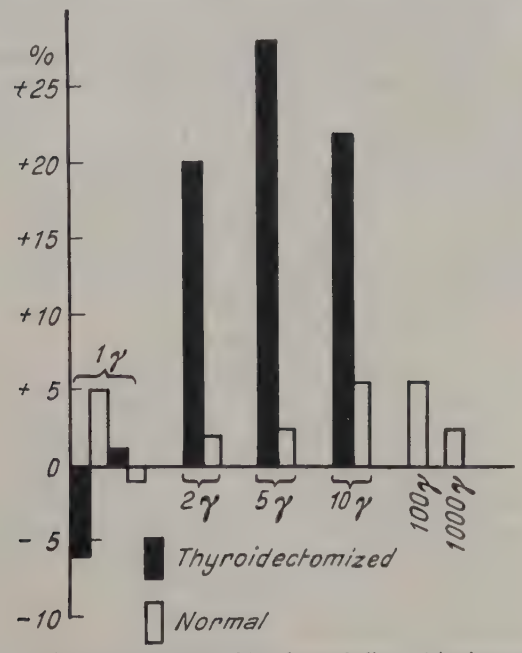



Fig. 1. – Changes in the rate of basal metabolism 24 h after a single dosis of thyroxine. The 0-line represents the B.M. before thyroxine injection.

more delayed action of single doses of thyroxine observed in the normal animals. Daily estimations of $O_2$-consumption for at least one week were all within the

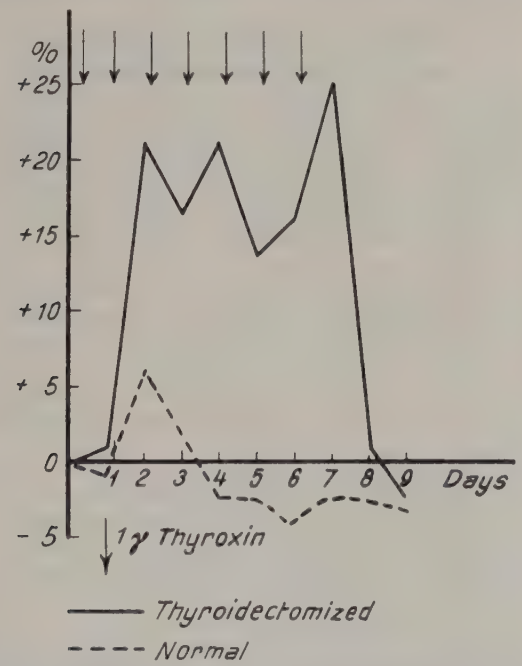



Fig. 2. – Changes in the rate of metabolism produced by 7·1 μg thyroxine. The 0-line represents the B.M. on the first day of the experiment.

normal range. In these experiments—performed during the summer months—single doses of thyroxine proved to be more than 500 times as effective in thyroidectomized animals as in normal rats. The doses of thyroxine employed are considerably smaller than hitherto used.

Fig. 2 and 3 show that repeated doses of thyroxine highly effective in thyroidectomized animals fail to raise the rate of metabolism in the normal animal. Daily doses of 10 μg or more ultimately raise the $O_2$-consumption of normal rodents also, and under these conditions a similar relative sensitivity to that described by Meyer and Wertz[1] was found.

Two explanations offer themselves for the great difference found between normal and thyroidectomized animals. The first would be that animals depleted of thyroxine and having therefore a low rate of metabolism (– 30 to – 40 %) react to much smaller doses than

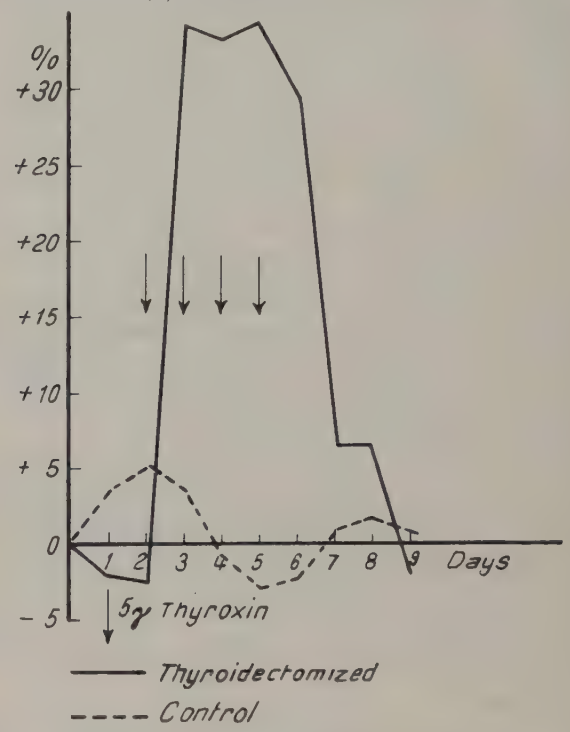



Fig. 3. – Changes in the rate of metabolism produced by 4·5 μg thyroxine. The 0-line represents the B.M. on the first day of the experiment.

animals with plenty of thyroxine in the tissues. The fact that thyroxine doses effective in normal subjects may have hardly any effect in hyperthyroidism could support this assumption. The second obvious explanation would be that the normal thyroid gland is able to buffer the action of large doses of thyroxine. The elective storage of iodine in the thyroid gland may be considered suggestive in this respect. The marked difference between the relative sensitivity towards single and repeated doses is not easy to explain in either case. Experiments devised to investigate this problem are in progress.

I. Andik, L. Balogh, Sz. Donhoffer, and Gy. Mestyán

Medical Clinic and Institute of Experimental Pathology, University of Pécs, January 3, 1949.

*Zusammenfassung*

Schilddrüsenlose Ratten mit einer Stoffwechselsenkung von 30–40 % reagieren auf die einmalige Injektion von 2 μg Thyroxin Schering nach 24 Stunden mit einer Stoffwechselsteigerung von etwa 20 %, während der

[1] A.E. Meyer and A. Wertz, Endocrinol. *24*, 683 (1939), cit. Ber. Physiol. *114*, 458.

Stoffwechsel normaler Ratten selbst von der einmaligen Injektion von 1 mg unbeeinflußt bleibt. Schilddrüsenlose Tiere sind daher einmaligen Thyroxingaben gegenüber mehr als 500mal so empfindlich als normale. Prüft man die Wirkung wiederholter Gaben, so ist der Unterschied bedeutend geringer und den Angaben von MEYER und WERTZ etwa entsprechend.

## Substances synaptolytiques, curarisantes et nicotinolytiques

On sait que différentes substances, parmi lesquelles la nicotine, le di-isopropylfluorophosphonate (DFP)[1], le hexa-éthyltétraphosphonate (HETP)[2] et l'acétylcholine, excitent les synapses ganglionnaires végétatifs et peuvent les paralyser ensuite.

D'autres substances paralysent les synapses autonomes périphériques, sans les stimuler d'abord. Parmi ces substances signalons le tétra-éthylammonium (TEA)[3], le diéthylaminoéthyl-ester de l'acide phénylcyclopentane carboxylique (Parpanit)[4], la phénothiazinyl-éthyl-diéthylamine (2987 R. P. ou Diparcol)[5], la tubocurarine, la méthyltubocurarine[6], le diiodoéthylate de bis(quinoléyl-8′)-1, 5-pentane (3381 R. P.)[7] et le lauryl-diméthyl-aminoéthanol (764 L.)[8]. Le Parpanit et le Diparcol paralysent également les éléments périphériques de l'innervation post-synaptique du parasympathique (action atropinique), et dépriment les centres nerveux moteurs (action anticonvulsive)[9]. Parmi ces substances synaptolytiques, certaines (tubocurarine, méthyltubocurarine, 3381 R. P. et 764 L.) sont également curarisantes, alors que les autres ne le sont pas.

Signalons, d'autre part, une substance synthétique, le triiodure de tri(triéthylammoniumméthoxy)-1, 2, 3- benzène (2559 F.), qui est très curarisant, tout en n'étant pas synaptolytique[10]. Les propriétés curarisantes et synaptolytiques ne sont donc pas liées l'une à l'autre.

Remarquons également que ces substances synaptolytiques et curarisantes sont dépourvues de propriétés anticholinestérasiques, à l'exception du Diparcol qui inactive, d'une manière sélective, la «pseudo-cholinestérase» *in vitro* et *in vivo*, sans inhiber la «vraie cholinestérase»[1]. Ces faits montrent que l'action curarisante et synaptolytique est indépendante de l'action anticholinestérasique.

Parmi les substances synaptolytiques et curarisantes, certaines possèdent une action antagoniste très prononcée vis-à-vis de la nicotine et les substances nicotiniques.

Nous avons observé que le Parpanit[2] et le Diparcol[3] protègent l'organisme vis-à-vis de très fortes doses de nicotine et de substances nicotiniques (acétylcholine, autres dérivés cholinergiques de la choline, DFP, HETP, hordénine, pilocarpine). Ces composés nicotinolytiques empêchent la bradycardie, les irrégularités cardiaques, la fibrillation cardiaque, l'hypertension, le bronchospasme, l'hyperpéristaltisme, la salivation, le myosis, les convulsions et les trémulations musculaires, provoqués par la nicotine et les substances nicotiniques, particulièrement le DFP. Le Parpanit et le Diparcol protègent également, mais à un moindre degré, le centre respiratoire contre l'action paralysante des substances nicotiniques.

Les curarisants synaptolytiques (tubocurarine, méthyltubocurarine, 3381 et R. P. 764 L.) possèdent les mêmes propriétés que le Parpanit et le Diparcol, mais ne protègent pas contre les actions muscariniques que certaines substances nicotiniques (acétylcholine et dérivés de la choline) possèdent également.

Le tétra-éthylammonium, substance synaptolytique très active, mais non curarisante, protège contre la bradycardie, le bronchospasme, l'hyperpéristaltisme, la salivation, l'hypertension et le myosis nicotiniques, mais ne protège pas contre les convulsions et les trémulations musculaires nicotiniques. Le 2559 F., curarisant non synaptolytique, protège contre les convulsions et les trémulations musculaires, mais non contre les autres actions nicotiniques.

Ajoutons que l'atropine protège contre la bradycardie, le bronchospasme, l'hyperpéristaltisme, la salivation et le myosis nicotiniques, mais non contre l'hypertension artérielle, les convulsions et les trémulations musculaires nicotiniques.

C. HEYMANS et G. VAN DEN HEUVEL

Institut de pharmacologie de l'Université de Gand (Belgique), le 14 février 1949.

*Summary*

Diethylaminoethyl ester of phenyl-cyclopentane carboxylic acid (Parpanit) and diaminoethylphenothiazine (2987 R. P., Diparcol), substances paralysing the autonomic synapses, the postsynaptic cholinergic innervation and the motor centers, protect very actively against nicotinic and cholinergic intoxication. Parpanit has no anticholinesterase action, while Diparcol inactivates selectively pseudo-cholinesterase *in vitro* and *in vivo*.

Curarizing and synaptolytic agents as tubocurarine, methyltubocurarine, diiodoethylate of bis (quinoleyl-8′-1, 5-pentane) (3381 R. P.) and lauryl-dimethyl-aminoethanol (764 L.), protect against nicotinic intoxication,

[1] C. HEYMANS, R. PANNIER et R. VERBEKE, Arch. int. Pharmacodyn. *72*, 405 (1946). – C. HEYMANS et J. JACOB, ib. *74*, 233 (1947). – R. VERBEKE, ib. *75*, 415 (1948); ib. *79*, 1 (1949).

[2] R. VERBEKE et Z. VOTAVA, ib., sous presse (1949).

[3] G. H. ACHESON et G. K. MOE, J. Pharmacol. *84*, 189 (1945); *87*, 220, 273 (1946). – R. E. BOELAERT, Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 417 (1948).

[4] R. DOMENJOZ, Schweiz. med. Wschr. *50*, 1282 (1946). – C. HEYMANS et G. R. DE VLEESCHHOUWER, Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 413, 307 (1948).

[5] H. GILMAN et D. A. SHIRLEY, J. Amer. Chem. Soc. *66*, 888 (1944). – D. BOVET, J. FOURNEL et P. CHARPENTIER, Thérapie *2*, 115 (1947). – C. HEYMANS, J. J. ESTABLE et S. CASTILLO DE BONNEVEAUX, C. R. Soc. biol. Montevideo (25 nov. 1948); Science *109*, 122 (1949) Arch. int. Pharmacodyn, sous presse (1949).

[6] C. HEYMANS, H. MAZZELLA et E. MIGLIARO, C. R. Soc. Biol. Montevideo (25 nov. 1948); Arch. int. Pharmacodyn., sous presse.

[7] D. BOVET, S. COURVOISIER, R. DUCROT et R. HORCLOIS, C. R. Acad. Sci. *1*, 597; *2*, 1733 (1947). – A. VAN DEN OOSTENDE, Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 419 (1948).

[8] L. BIHAN et coll., ib., sous presse (1949). – M. J. DALLEMAGNE et E. PHILIPPOT, ib., sous presse (1949). – G. VAN DEN HEUVEL, ib., sous presse (1949).

[9] C. HEYMANS, J. J. ESTABLE et S. CASTILLO DE BONNEVEAUX, C. R. Soc. biol. Montevideo (25 nov. 1948); Science *109*, 122 (1949); Arch. int. Pharmacodyn., sous presse (1949).

[10] D. BOVET, F. DEPIERRE et Y. DE LESTRANGE, C. R. Acad. Sci. *2*, *74* (1947). – A. VAN DEN OOSTENDE, Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 419 (1948).

[1] C. HEYMANS, J. J. ESTABLE et S. CASTILLO DE BONNEVEAUX, C. R. Soc. biol. Montevideo (25 nov. 1948); Science *109*, 122 (1949); Arch. int. Pharmacodyn., sous presse (1949). – J. J. GORDON, Nature *162*, 146 (1948).

[2] C. HEYMANS et G. R. DE VLEESCHHOUVER, Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 413, 307 (1948).

[3] C. HEYMANS, J. J. ESTABLE et S. CASTILLO DE BONNEVEAUX, C. R. Soc. biol. Montevideo (25 nov. 1948); Science *109*, 122 (1949); Arch. int. Pharmacodyn., sous presse (1949).

but do not suppress the muscarinic actions of cholinergic agents.

Triiodate of tri(tri-ethylammonium-methoxy)-1, 2, 3-benzene (2559 F.), curarizing, but not synaptolytic substance, protects only against nicotinic convulsions and muscular fasciculations.

Tetra-ethyl-ammonium, synaptolytic substance, protects only against synaptic stimulations induced by nicotinic agents.

Atropine protects against nicotinic and muscarinic actions of nicotinic substances, but not against nicotinic convulsions and muscular fasciculations.

The curarizing and synaptolytic substances as well as atropine do not inhibit cholinesterases. Thus no correlation exists between anticholinesterase, synaptolytic and nicotinolytic properties.

## Reduktionsfähigkeit des Urins bei Nierenkrankheiten

Bei Normalkindern schwankt die Reduktionsfähigkeit des Urins zwischen 10 und 200 mg v. H. nach Hagedorn-Jensen (auf Glukose umgerechnet). Parallel mit der Reduktionsfähigkeit nehmen auch Gesamtstickstoffgehalt, Bisulfitbindungsfähigkeit und Gesamtketongehalt des Urins zu.

Bei Nephritis werden die stickstoffhaltigen Substanzen schlecht ausgeschieden, weil die Menge des Glomerulusfiltrats verringert ist und auch die tubuläre Resorption zunehmen kann[1]. Bei Nephrose kann die Ausscheidung der stickstoffhaltigen Stoffe erhöht sein, was mit dem Eiweiß- und Aminosäureverlust des Organismus zusammenhängen mag[2].

Da die Reduktion des eiweiß- und zuckerfreien Urins vor allem durch die Reduktion von stickstoffhaltigen Stoffen bedingt ist, bestimmten wir den Reduktionswert von 0,1 cm³ Urin nach Hagedorn-Jensen bei Kranken, die das klinische Bild von Nephritis bzw. Nephrose aufwiesen.

13 nierenkranke Kinder wurden von diesem Gesichtspunkt aus untersucht. Bei 2 bestand klinisch eine klassische Nephrose, bei 4 eine Mischform, bei den übrigen eine Glomerulonephritis. Im Urin von 1008–1010 spez. Gewicht fanden wir bei Nephritis im allgemeinen niedrige Reduktionswerte (26, 44, 48, 50, 60, 86, 145 mg v. H.). Bei Nephrose waren die Reduktionswerte bei gleichfalls niedrigem spez. Gewicht – in schwerem Allgemeinzustand – über 380 mg v. H. im eiweißfreien Urin. Glukose kam als reduzierender Stoff nicht in Betracht, wie es durch Gärungsproben bewiesen werden konnte. Bei Nephrose war Verschlimmerung und Besserung des Zustandes durch die Zunahme bzw. Abnahme des Reduktionswertes gekennzeichnet. Dieses Zeichen trat früher ein als die Zu- bzw. Abnahme der Eiweißausscheidung. Im Urin von hohem Reduktionswert war die Ausscheidung der nichteiweißartigen stickstoffhaltigen Substanzen hoch. Allerdings, die hohen Reduktionswerte lassen sich weder durch die Harnsäurewerte allein noch durch die kreatinin- oder sogar die bisulfitbindenden Substanzen allein erklären. Untersuchungen zur Identifizierung der reduzierenden Stoffe sind im Gange. Der Reduktionswert des Urins hat nun bei Nierenkrankheiten eine diagnostische Bedeutung. Darüber hinaus kommt dem Reduktionswert auch eine prognostische Bedeutung zu, da er bei Besserungen und Verschlimmerungen ab- bzw. zunimmt.

Es hat den Anschein, daß die Vermehrung von nichteiweiß- und nichtzuckerartigen reduzierenden Stoffen im Urin ein empfindliches Zeichen des pathologischen Eiweißzerfalls darstellt.

L. Barta

Universitätskinderklinik Budapest, den 20. Januar 1949.

*Summary*

The quantity of the non-protein and non-carbohydrate reducing substances is in the urine, generally, low in nephritis but high in nephrosis. In our view, the high reductive capacity of the urine may be considered as a symptom of the pathologic protein decomposition.

[1] P. Gömöri, M. Földi und G. Szabó, Orvosok Lapje *4*, 258 (1948).

[2] S. P. Gottfried, J. Steimann und B. Kramer, Amer. J. Dis. Childr. *74*, 283 (1947).

[3] L. E. Farr, J. Paed. *17*, 734 (1940).

# DISPUTANDA

## Zur Frage der Beziehungen zwischen Anfällen von Spasmophilie und ultravioletter Sonnenstrahlung

Unter diesem Titel erhebt Mörikofer in Exper. V/2, S. 86 (1949), mehrere Einwände gegen die Beweisführung unserer Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen meteorologischen Faktoren und spasmophilen Krämpfen, die wir in dieser Zeitschrift kurz zusammengefaßt und in den Acta Paed. Lat. *7*, 11 (1948) ausführlicher veröffentlicht haben.

Gegen diese Einwände glauben wir folgendes bemerken zu müssen:

1. In unserer ausführlicheren Veröffentlichung werden wohl alle von Mörikofer angeführten meteorologischen Gesichtspunkte ausdrücklich, wenn auch kurz, diskutiert. Trotz der gar nicht verheimlichten Ungenauigkeit der Berechnung (die übrigens nicht, wie Mörikofer unzutreffend annimmt, die Bewölkung des Himmels vernachlässigt[1]), heben wir deshalb die überraschende Tatsache hervor, daß nur das grob errechnete UV, nicht aber irgendeine der originalen meteorologischen Daten, die uns zur Verfügung standen[2], mit den Krampfanfällen auf statistisch gesicherte Weise in Zusammenhang zu bringen war, weil unsere Beobachtung auf dem relativen Vergleich zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen von je 330 mit den mit der gleichen Ungenauigkeit berechneten UV-Tagesdosen beruht. Dies dürfte wohl unsere Annahme einer reellen Zunahme des UV im Außenklima rechtfertigen und die genaue Kenntnis der absoluten Werte entbehren lassen.

2. Wenn wir dann annehmen, daß ein größerer UV-Reichtum des Außenklimas letzten Endes eine D-Vitamin-Wirkung im Organismus leichter zustande kommen lasse, dann kann diese Annahme doch nicht als sinnlos gelten, weil ja das UV direkt (durch Bestrahlung der Haut im Freien oder durch offene Fenster), aber auch indirekt (z. B. über die Bildung von D-Vitamin im Organismus weidender Kühe oder sich ins Freie begebender Mütter und Abscheidung des Vitamins in die Milch) wirken kann. Das Innenklima ist somit kein

[1] Siehe Seite 21 unserer zitierten Arbeit, wo wir eine Korrektur von —5,6% diffusen UV pro 1/10 Bewölkung (nach Büttner) vornehmen.

[2] Und zwar: Barometerstand, Temperatur *mn* und *mx*, Feuchtigkeit relativ und absolut, Bewölkung, Niederschläge, Sonnenstunden und deren Verteilung.

obligater Vermittler des Außenklimas. Um weiter die Möglichkeit unserer augenscheinlich nicht unumgänglichen Inhalationshypothese anzufechten, wird man wohl die Möglichkeit der Suspension in der Luft sterinhaltiger Mikrokörper tierischen oder pflanzlichen Ursprungs ausschließen müssen, und das lassen wir ja dahingestellt. Jedenfalls haben wir diese Hypothese nur etwas mehr in den Vordergrund gerückt, weil sie neu ist, während die kurz angedeutete alimentäre Hypothese wohl seit Jahrzehnten als bewiesen gilt.

3. Andere Strahlenbezirke außer dem UV fassen wir deshalb nicht ins Auge, weil uns kein guter Grund bekannt ist, ihnen eine krampfauslösende und Blut-Ca$^{++}$-senkende Wirkung zuzuschreiben, die dagegen für das UV unter gewissen Umständen klinisch und experimentell bewiesen ist.

4. Aus indirekten Gründen wird seit Jahren von den besten Kennern der Krankheit angenommen – und es ist in letzter Zeit direkt, und auf verschiedene Weise, von HARNAPP[1] und von SARTORI[2] festgestellt worden –, daß sich die vegetative Störung der Spasmophilie nicht ohne eine beträchtliche Senkung des Blut-Ca$^{++}$ manifestiert. Deswegen hielten wir es für lohnender, diesen gesicherten Ring der langen pathogenetischen Kette in den Vordergrund zu stellen, um uns im Wirrwarr der allgemeinen Meteoropathologie nicht zu verirren, wo ja die «überzeugende und allseitig befriedigende Lösung» noch ausbleibt.

Aus den angeführten Gründen halten wir unsere Arbeitshypothese, nach welcher die meteorologischen Vorgänge insofern die Spasmophilie beeinflussen, als sie das UV des Tageslichts und dessen mittelbare und unmittelbare Wirkung auf das Blut-Ca$^{++}$ prädisponierter Organismen ändern, als nicht widerlegt. Wir schließen deswegen die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung der Krankheit durch andere mehr oder minder komplexe meteorologische Vorgänge aber nicht ausdrücklich aus.

E. SARTORI und M. BOLLETTI

Clinica Pediatrica dell'Università di Padova, den 13. Dezember 1948.

*Summary*

With reference to a communication of W. MÖRIKOFER (Exper. *5*, 86 [1949]) concerning some remarks on our own communication about the relation between U.V. light and spasmophilic convulsions (Exper. *4*, 279 [1948]) we point out that:–

(1) Our estimations concern not only the radiation of the sun, as MÖRIKOFER erroneously assumes, but also the radiation of the sky.

(2) The indoor climate is not necessarily a mediator between the open-air climate and the organism; our hypothesis of inhalation of activated substances is not the only possible explanation, however the alimentary mediation of U.V. light is still quite accepted.

(3) A causal relation between the meteorological element and convulsions is not derived from the numerical relation, but from clinical and experimental knowledge, which is discussed; and never is the relation said to be necessarily a direct one.

(4) Our investigation is a statistical and clinical, not an experimental one. This may be performed by others.

[1] HARNAPP, Klin. Wschr. *2*, 1731 (1938).
[2] E. SARTORI, Atti XVIII Congr. Ital. Pediatr. *2*, 810 (1947).

## Chemistry of Ajmaline

## Rauwolfine of Van Itallie and Steenhauer[1]

*Editorial Remark;– The following* "Disputandum" *is not a brief report in the generally accepted sense. The paper deals with a subject which might be interesting both to Chemists and Biologists and for this reason the editors have allotted to it more than the usual space.*

Ajmaline has been isolated from the roots of *Rauwolfia serpentina* BENTH. and the general properties ascribed to it by VAN ITALLIE and STEENHAUER[2] and by S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI[3] have been noted in the case of our material. The composition, $C_{20}H_{26}O_2N_2$, has been confirmed.

*Function of the nitrogen atoms*

The base has strychnidine-like reactions and contains N(a) directly attached to an aromatic nucleus with a free and reactive *para*-position. It affords a methyl orange on coupling with diazobenzenesulfonic acid and the indicator behaviour of this substance resembles closely that of sulphobenzo-azo-strychnidine. The base obtained on reduction of the azo-derivative has the colour reactions expected of *a p*-aminodialkylaniline derivative. The colour reactions with nitric acid and with ferric chloride further exemplify this point and by the action of nitrous acid on the base in dilute hydrochloric acid, an orange yellow *p*-nitroso-ajmaline hydrochloride is produced; the free nitroso-base gives green solutions in neutral organic solvents. N(a) is undoubtedly tertiary and bears a methyl group (see below).

N(b) is the basic nitrogen atom and, contrary to the view of SIDDIQUI (loc. cit.) it is also tertiary.

Ajmaline methiodide[4] crystallized from aqueous methanol and dried at 100°C *in vacuo*, had m. p. 229° (Found: C, 53·9, 53·7, 53·9; H, 6·2, 6·2, 6·4; I, 26·7, 26·8. $C_{21}H_{29}O_2N_2I$ requires C, 53·9; H, 6·2; I, 27·1%). This is a *quarternary* salt convertible into ajmaline methohydroxide, m. p. 124° from aqueous methanol (Found in material dried at 100°: C, 70·6; H, 8·4. $C_{21}H_{30}O_3N_2$ requires C, 70·4; H, 8·4%). R. H. SIDDIQUI[5] found, in a single analysis that could not be repeated for lack of material: C, 74·9; H, 8·85%. The erroneous conclusion was drawn that the substance was methylajmaline, $C_{21}H_{28}O_2N_2$.

A solution of ajmaline methochloride was obtained by action of precipitated silver chloride on the methiodide in aqueous methanolic solution. This salt was then found to couple normally with diazobenzenesulfonic acid to a methyl orange exhibiting the characteristic indicator properties. There is therefore no doubt but that N(b) is the basic centre and, furthermore, ajmaline is a di-*tert*-base which, like strychnidine and tetrahydrostrychnine, forms salts with one equivalent of acid when in contact with alcohol or water.

*Function of the oxygen atoms*

Contrary to the above-mentioned view R. H. SIDDIQUI[6] has described a benzoyl derivative which is

[1] Cf. also KARRER-FESTSCHRIFT, April 1949.
[2] L. VAN ITALLIE and A. J. STEENHAUER, Arch. Pharm. *270*, 313 (1932).
[3] S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI, J. Ind. Chem. Soc. *8*, 667 (1931); *9*, 539 (1932); *12*, 37 (1935). – R. H. SIDDIQUI, Inaug. Diss. Aligarh, 1934.
[4] Cf. S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI, loc. cit., who only give MeN analysis; 2 MeN were found.
[5] R. H. SIDDIQUI, Inaug. Diss., Aligarh, 1934.
[6] R. H. SIDDIQUI, Inaug. Diss., Aligarh, 1934.

feebly basic, and hence considered to be a N-benzoyl derivative and also a N-nitroso-derivative. The latter appears to be a nitrite or an O-nitroso-derivative and will be further studied. The former has been reexamined. It is an O-*benzoylajmaline*, m. p. 219° after crystallization from ether or aqueous methanol (Found in material dried at 100° *in vacuo*: C, 74·9, 74·9; H, 7·0, 7·1. $C_{27}H_{30}O_3N_2$ requires C, 75·3; H, 7·0%). The hydrochloride, from alcohol-ether, blackened at 267° (Found after drying at 120° *in vacuo*: C, 69·4; H, 6·5. $C_{27}H_{31}O_3N_2Cl$ requires C, 69·4; H, 6·6%).

Ajmaline forms, however, a *diacetyl*-derivative when it is heated with acetic anhydride. The base, crystallized from ether-light petroleum (b. p. 40–60°), had m. p. 132° (Found in material dried at 100° *in vacuo*: C, 70·2, 70·2; H, 7·4, 7·3; Ac, 22·5. $C_{24}H_{30}O_4N_2$ requires C, 70·2; H, 7·3; 2 Ac, 21·0%).

It is shown below that ajmaline is an aldehyde, or contains a sugar-like, cyclic, acetal group equivalent to an aldehyde. It is therefore probable that this *diacetate* is an enol-acetate *plus* alcohol acetate, containing $\rangle C{=}CHOAc$ and $\rangle COAc$. If it were an alkylidene diacetate, $—CH(OAc)_2$, there would still be $\rangle C(OH)$ available, and a *triacetate* should have been formed.

H. W. Thompson[1] kindly examined the infra red absorption spectrum and reported the presence of hydroxyl but no carbonyl group. However, we have noted that ajmaline readily reduces an ammoniacal silver solution and accordingly suspected a latent aldehyde group to be present in the molecule. Following this up it was found that ajmaline yields an *oxime*.

The oxime *hydrochloride*, dried at 100° *in vacuo* over phosphoric anhydride, loses 4·1% and then melts with frothing at 218° ($C_{20}H_{27}O_2N_3$, HCl, 2 $H_2O$ requires 1 $H_2O$, 4·3%) (Found in dried material: C, 60·4; H, 7·5; N, 10·4. $C_{20}H_{27}O_2N_3$, HCl, $H_2O$ requires C, 60·6; H, 7·6; N, 10·6%). The free *oxime* (unsharp m. p.) was dried at 100° *in vacuo* (Found: C, 70·6; H, 7·8; N, 12·1. $C_{20}H_{27}O_2N_3$ requires C, 70·4; H, 7·9; N, 12·3%). At this stage it was noted that ajmaline gives a positive Angeli-Rimini reaction.

R. N. Chakravarti and R. Robinson[2] have investigated an oxidation product of neostrychnine, oxodihydroallostrychnine, which was considered to be a basic aldehyde. This substance combines characteristically with sulfur dioxide to a sulfonic acid betaine ($—SO_3^-$, $\rangle NH^+$). Ajmaline forms a similar *compound* This, crystallized from aqueous methanol, had m. p. 225° when moderately quickly heated (Found: C, 57·4; H, 7·1; S, 7·1, 7·2; loss at 100° *in vacuo*, 22·9. $C_{20}H_{26}O_2N_2$, $SO_2$, 2 $H_2O$ requires C, 57·6; H, 7·0; S, 7·5; $SO_2$+2 $H_2O$, 23·4%).

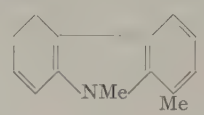
*Catalytic hydrogenation of ajmaline*

It has been independently observed in our two laboratories that ajmaline affords a hexahydro-derivative which crystallizes from aqueous alcohol and has m. p. 150° (Found in material dried at 100° *in vacuo* C, 72·1, 71·9; H, 9·5, 9·4. $C_{20}H_{32}O_2N_2$ requires C, 72·2; H, 9·6%). This base does not exhibit the nitric acid and ferric reactions of ajmaline but it still couples with diazotized sulfanilic acid to a methyl orange. Fission at N(b) was possible, but the base appears to be tertiary. We now believe that this seemingly homogeneous substance is nevertheless a mixture and we are engaged in further experiments with different catalysts. There is little doubt that ajmaline contains at least one double bond. Nevertheless the dibromide of Siddiqui[1] is probably a bromo-hydrobromide.

*Degradation of ajmaline*

(A) *Distillation over soda-lime.*—The bases in the distillate were dissolved in dilute hydrochloric acid and in this way one of them was eventually obtained as a *hydrochloride* crystallizing in very pale yellow needles. The solutions showed a strong violet fluorescence. The corresponding *base* crystallized from aqueous methanol, water, or ether, in glistening needles; plates from acetone, m. p. 102°. The fluorescence was reminiscent of harman, m. p. 238°, but the m. p. was very low for this series. However, Iyer and Robinson[2] found that Ind-N-methylharmine has m. p. 124–5° (dry) whereas harmine has m. p. 259°. Analysis showed that the base, m. p. 102°, actually contains 1 MeN and 1 MeC. Hence it was very probably Ind-N-*methylharman* (I). This was proved to be the case by synthesis.

Harman (from tryptophan) in liquid ammonia was treated successively with potassamide and methyl iodide[3]. The product was identified by m. p. 102°, undepressed mixed m. p., and comparison of properties, with the degradation product from ajmaline (Found in material dried over phosphoric anhydride *in vacuo;* C, 79,4; H, 6·1; Me(N), 7·1; Me(C), 7·6. $C_{13}H_{12}N_2$ requires C, 79·6; H, 6·1; 1 Me, 7·6%).



(I)

The neutral moiety of the degradation products contained substances possessing indolaceous odour and *carbazole* was recognized by colour reactions, fluorescence in U.V. light, and by absorption spectrum; it was not isolated in substance.

(B) *Distillation of ajmaline over zinc dust.*— The distillate was separated into basic and neutral fractions and from the former *Ind-N-methylharman*, m. p. 102°, was isolated. The neutral fraction contained carbazole, chromatographically separated and finally crystallized from light petroleum (b. p. 40–60°). The substance had m. p. 236° alone or mixed with an authentic specimen and it showed the colour reactions and U.V. spectrum of carbazole. Approximately equal amounts of the two isolated degradation products were obtained.

*Discussion.*—On the basis of the results described and a consideration of the chemistry of yohimbine and strychnine, possible constitutions for ajmaline are II and III.

The formula (II) is closely related to strychnine and arises biogenetically by N(a) methylation and reduction of an indolenine, thus blocking the formation of the

[1] H. W. Thompson, Physical Chemical Laboratory, Oxford University.

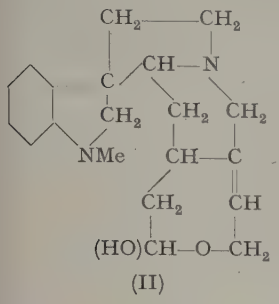
[2] R. N. Chakravarti and R. Robinson, Nature *160*, 18 (1947); paper read to Organic Chem. Sect. Int. Congress of Chem., July 1947; full account in press.

[1] R. H. Siddiqui, Inaug. Diss. Aligarh, 1934.

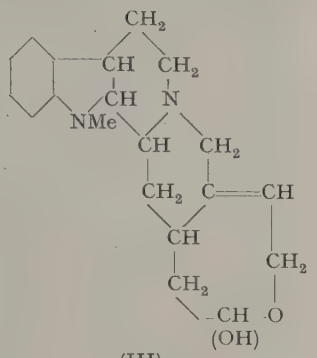
[2] V. V. S. Iyer and R. Robinson, J. Chem. Soc. 1637 (1934).

[3] A device used by A. M. Stephen and R. Robinson in the synthesis of vomipyrine, cf. Nature *162*, 167 (1948).

N(a) piperidone ring of strychnine as in WOODWARD's[1] mechanism. On this basis, the Ind-N-methylharman is formed by a migration of a type which is common ($-CRR_1-CH\swarrow \rightarrow -CR=CR_1-$), especially when an aromatic system is produced. Carbazole from (II) arises by



(II)



(III)

dehydrogenation of an open hexane chain to an aromatic nucleus. The formula (III) gives Ind-N-methylharman without migration, but carbazole formation is much more difficult to explain than with (II). Furthermore (II) contains a blocked hydro-indole structure and hydro-indoles which can theoretically be dehydrogenated to an indole derivative as in (III) have not been found in Nature. For these reasons we adopt (II) as a working hypothesis, fully recognizing the many speculative features which demand further investigation. We are actively engaged in following up the research on ajmaline and its congeners.

(Miss) D. MUKHERJI, R. ROBINSON, and E. SCHLITTLER

Dyson Perrins Laboratory, South Parks Road, Oxford, and Chemical Research Laboratory, Ciba, Basle, Oxford and Basle, December 23, 1948.

*Zusammenfassung*

Die funktionellen Gruppen des Indolalkaloids Ajmalin (Rauwolfin) werden aufgeklärt und die Base wird mit Natronkalk und mit Zinkstaub destilliert. Die Abbauresultate lassen vermuten, daß es sich beim Ajmalin um einen Körper handelt, der Strukturelemente des Strychnins enthält. Als weniger wahrscheinliche Alternative wird eine Struktur vorgeschlagen, die der Yohimbinformel nahesteht.

[1] R. B. WOODWARD, Nature *162*, 155 (1948).

# Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

## Farmacología y sus aplicaciones terapéuticas

Por CARLOS GUTIERREZ-NORIEGA
(Editora Médica Peruana, Lima/Perú, 1946) (515 pág.)

Das gut ausgestattete Buch stellt einen neuen und interessanten Versuch dar, das alte Problem des pharmakologischen Lehrbuchs zu lösen. Der Verfasser ist sich der Tatsache bewußt, daß moderne Pharmakologie in ihren Problemstellungen weit über die Therapie, oft sogar über die gesamte Medizin hinausgreift. Er beschränkt sich daher mit voller Absicht auf die Gebiete, die sowohl für den Pharmakologen, als auch für den therapeutisch tätigen Arzt von Interesse sind. In strenger Verfolgung dieses Prinzips wird die Toxikologie als pharmakologisches Teilgebiet nur insoweit besprochen, als sie sich mit therapeutischen Problemen überschneidet. Die Stoffeinteilung, die immer Diskussionen bei der Besprechung von Lehrbüchern verursacht, ist dem Verfasser bemerkenswert gut gelungen. In zwei Hauptgruppen, die den arzneitherapeutischen Zielen folgen, werden die wichtigsten Stoffklassen eingeordnet:

Die erste umfaßt die als organotrop bezeichneten Medikamente. Hierher gehören alle Pharmaka, die einen Hauptangriffspunkt in Organen, Geweben oder differenzierten Zellen des menschlichen Organismus haben und zu dessen Beeinflussung verabreicht werden. Die experimentelle Seite dieser Gruppe entspricht also der klassischen Pharmakologie, dem großen Tierexperiment, das mit dem Ziel der Wirkungsaufklärung am differenzierten Organismus angestellt wird. Therapeutisch deckt sich der Inhalt dieses Teiles mit der Arzneitherapie ohne Chemotherapie, ist also in vielen Fällen symptomatische Therapie.

In der zweiten Hauptgruppe wird die Chemotherapie bakterieller und anderer Infektionen vom experimentellen und klinischen Standpunkt aus betrachtet. Sie behandelt also die Beeinflussung von Fremdorganismen *im* menschlichen Körper. Hier sind die als ätiotrop bezeichneten Arzneimittel zusammengefaßt, deren Wirkungen auf Organsysteme des Wirtes nur dann abgehandelt werden, wenn sie die Therapie beeinträchtigen.

Die angegebene Einteilung scheint dem Referenten, solange die in der Pathologie übliche Trennung in allgemeine und spezielle Behandlung des Gegenstandes nicht durchgeführt ist, die zurzeit beste für Ärzte und Studenten zu sein. Sie richtet sich nach dem therapeutischen Handeln und spricht daher den Kliniker und den Arzt in der Praxis unmittelbar an. Das Streben, Übersicht zu vermitteln, geht auch im einzelnen aus der Darstellung hervor. So wird bei den zentralen Erregungsmitteln nicht jeder Stoff für sich, sondern *die analeptische Wirkung* in den Vordergrund gestellt, wobei die Besonderheiten der einzelnen Medikamente nicht vergessen werden. Einzelne Abweichungen von dem Prinzip, die Wirkung im Licht, die Stoffe im Schatten zu lassen, machen das Buch nur interessanter. Wenn etwa im Kapitel «Lokalanästhesie» das Kokain außergewöhnlich breit dargestellt wird, wird man dies im Heimatland der Koka nur verstehen und als darüber weniger orientierter Leser begrüßen können. Für den Arzt in Europa ist das Buch besonders von Bedeutung, weil es die internationale Literatur, auch die deutsche, weitgehend berücksichtigt. Amerikanische Arbeiten sind bis 1945 verarbeitet. An wichtigen Stellen sind diese Arbeiten zitiert. Das sachliche Abwägen der einzelnen Befunde ist ein Verdienst des in den Weltsprachen sehr

belesenen Autors. Technisch bleiben, was den Satz und die Wiedergabe der Abbildungen und Formeln angeht, einige Wünsche offen.

Vier Portraits, die den zweiten Teil einleiten, stellen den «Vorläufer der Chemotherapie» Paracelsus, den «Schöpfer der Chemotherapie» Paul Ehrlich, den «Entdecker der Sulfonamide» G. Domagk und den «Entdecker des Penicillins» A. Fleming dar. Sie betonen die Bedeutung, die der Verfasser der ätiotropen Therapie beimißt. Zugleich kann man sie als Ehrung für diese Pioniere und als Beispiel für die Studenten auffassen, die sich in unser Fach anhand eines so schönen Lehrbuchs einarbeiten dürfen.

K. Soehring

### Die Sauna

Von V. R. Ott. 224 S., 29 Abb.
(Benno Schwabe & Co., Basel 1948) (Fr. 15.–)

Ein kleines Saunahandbuch, in dem die eigenen Erfahrungen und Untersuchungen des Autors ausführlichen Niederschlag finden. Nach einigen geschichtlichen Kapiteln über die Schwitzbäder im Altertum und in der Neuzeit und die Sauna werden die eigenen Erfahrungen mit der Sauna dargelegt. «Die auffälligste unmittelbare Wirkung des Saunabades ist die Hebung des Allgemeinbefindens; sie ist sicher nicht nur als Suggestiverfolg zu werten, sondern entspricht einem organischen Geschehen» (S. 55). Einen wesentlichen Teil des Buches nehmen die «Experimentellen Grundlagen der Saunawirkung» ein, hauptsächlich die Auswirkung auf den menschlichen Organismus. Diese werden als ein Nebeneinander von zwei neurovegetativen Reizzuständen aufgefaßt: einerseits eine trophotrop-parasympathikotone Funktion mit dem Ziel der Erhaltung der normalen Körpertemperatur und anderseits ein durch Hyperthermie zentral ausgelöster Reizzustand sympathikotonen Charakters. Als Resultante folgt nach einer kurzen parasympathikotonen Initialphase ein je nach der vegetativen Grundeinstellung mehr oder weniger starkes Überwiegen des Sympathikotonus, der im Gegensatz zum künstlichen Fieber noch eine Weile nach dem Temperaturabfall anhält (Frösteln nach dem Saunabad), um dann erst durch eine ausgesprochene parasympathikotone Nachphase (Appetit und Schläfrigkeit) abgelöst zu werden.

Da Tonusänderungen im vegetativen Nervensystem von großer Bedeutung für die spezifischen und unspezifischen Abwehrreaktionen sind, erklären sich Heilwirkungen bei Infektionen ohne weiteres. Als Hauptindikationen werden genannt, bei Gesunden: Erholung nach körperlichen Anstrengungen, Leistungssteigerung, Erkältungsprophylaxe. Sehr mager fällt bei der kritischen Einstellung des Verfassers das Verzeichnis der Indikationen bei Erkrankungen aus: akute Katarrhe, leichte (!) grippale Infekte im frühesten Stadium, chronische unspezifische Katarrhe der oberen Luftwege, gewisse rheumatische Leiden und schlecht heilende infizierte Wunden, leichte neurovegetative Störungen und gewisse dermatologische Affektionen (chronisches Ekzem, Urticaria, Psoriasis). Schließlich werden in einem kurzen Anhang Bau und Betrieb der Sauna besprochen.

H. Ludwig

# Informations - Informationen - Informazioni - Notes

## STUDIORUM PROGRESSUS

*Avant-propos de la rédaction: Sous la rubrique* STUDIORUM PROGRESSUS, *nous allons publier à l'avenir de temps en temps une suite de brefs rapports sur le progrès des recherches scientifiques dans les diverses branches.*

*Redaktionelle Vorbemerkung: Unter* STUDIORUM PROGRESSUS *veröffentlichen wir in Zukunft in zwangloser Folge kurze Forschungsberichte über Fortschritte in deh einzelnen Spezialgebieten.*

*Avvertenza della redazione: Sotto* STUDIORUM PROGRESSUS *pubblicheremo in avvenire senza ordine determinato brevi relazioni sui progressi di singoli campi speciali delle scienze.*

*Editorial Remark:— Under the title* STUDIORUM PROGRESSUS *we shall publish in the future from time to time brief reports of research in various special fields.*

### Die Halterenfrage

Von F. Schaller[1], Mainz

Die Hinterflügel der Dipteren sind zu relativ kleinen Schwingkölbchen oder Schwingern umgebildet, welche Halteren genannt werden (Abb. 1 *a*, *b*). Diese werden beim Flug genau wie echte Flügel auf und ab bewegt. Schon im Jahre 1711 hat Derham diese Organe beschrieben und festgestellt, daß sie durchaus keine funktionslosen Rudimente sind. Er beobachtete nämlich,

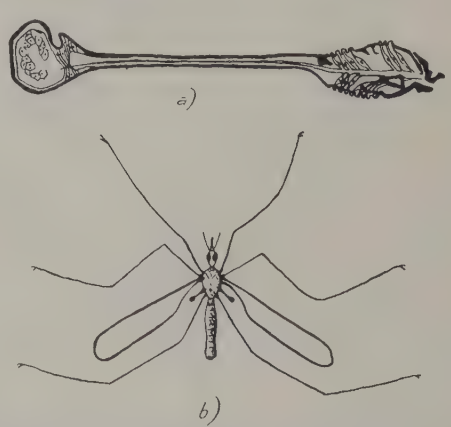



Abb. 1. *a*) Haltere im Längsschnitt, rechts Basis mit Sinneszellen *b*) *Tipula* sitzend, die Halteren sind deutlich zu sehen (nach v. Buddenbrock, 1937).

daß die Entfernung der Halteren zu weitgehenden Störungen der Flugfähigkeit der Dipteren führt. Deshalb verglich er sie mit den Balancierstangen der Seiltänzer

[1]) Zoologisches Institut der Universität Mainz.

und hielt sie für Gleichgewichtsorgane. In der Folge haben v. Gleichen, 1764, Lowne, 1890/95, und Stellwaag, 1916, die gleiche Ansicht vertreten. Daneben sind den Halteren aber noch verschiedene andere Funktionen und Bedeutungen zugeschrieben worden: Jousset de Bellesme, 1878, und Weinland, 1891, hielten sie für Steuerorgane. v. Gleichen, 1764, und Landois, 1867, meinten, sie dienten zur Schallerzeugung. Leydig, 1860, Lowne, 1870, und Graber, 1882, hinwiederum hielten

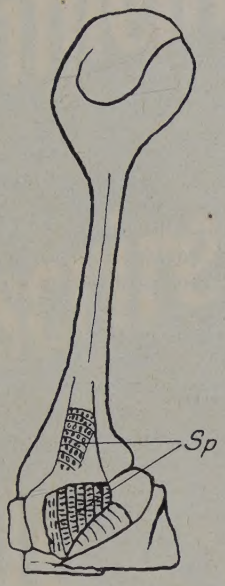



Abb. 2. Rechte Haltere von *Sarcophaga carnaria*, dorsal gesehen. *Sp* Sinnespapillen (nach Pflugstaedt, 1912).

sie für Gehörorgane. Hicks, 1857, und Lee, 1885, schrieben ihnen Geruchsfunktion zu. Latreille, 1821, Chabrier, 1822, Goureau, 1843, Loew, 1858, und Landois, 1867, schließlich ließen sie der Respiration dienen[1].

Vom Beginn des 18. Jahrhunderts ab bis in die Zeit des ersten Weltkriegs sind also nicht weniger als sechs verschiedene Theorien über die Halteren und über ihre Funktion aufgestellt worden. Kein anderes Organ bei wirbellosen Tieren hat in gleicher Weise die Aufmerksamkeit der Naturforscher erregt und keines trotzte so hartnäckig jedem Erklärungsversuch.

Der Feinbau der Halteren ist 1912 von Pflugstaedt[3] endgültig aufgeklärt worden. Als charakteristische Elemente tragen sie an der Außenseite ihrer Basis eine wechselnde Zahl von einzeln innervierten Sinneskuppeln oder Papillen (Abb. 2, 3*a*, *b*), und im Innern des Basalteils mehrere Chordotonalorgane, welche Leydig schon 1860 entdeckt hat.

Die obengenannten Theorien hatten stets nur die Halteren selbst im Auge und bemühten sich, aus ihrem Bau und ihrer Funktionsweise den rätselvollen Einfluß derselben auf das Flugvermögen der Dipteren zu verstehen. Das einzige Experiment, welches immer wieder zum Ausgangspunkt der Erklärungsversuche gemacht wurde, die Exstirpation der Halteren, zeigte jedenfalls, daß die Dipteren ohne sie kaum normal fliegen können. Manche Arten verlieren nach der Operation überhaupt das Flugvermögen. Jousset de Bellesme machte 1887 als erster die weitere wichtige Entdeckung, daß Festkleben der Halteren ebenso wirkt wie Entfernung derselben. Dadurch wurde der Beweis erbracht, daß die Halteren ihre Funktion nur erfüllen können, wenn sie bewegt werden.

Die letzten Arbeiten vor dem ersten Weltkrieg gingen vor allem von dieser Beobachtung aus und vertraten ernsthaft nur mehr zwei Theorien: Steuerung (Weinland[1], 1891) und Gleichgewichtserhaltung (Lowne, 1890–95). 1916 vertrat Stellwaag nochmals letztere Theorie.

Im nächsten Jahre erschien v. Buddenbrocks[2] erster Aufsatz über die Halterenfrage, welcher im Felde geschrieben worden war. Den Umständen entsprechend war er rein theoretischer Natur, doch barg er bereits des Rätsels Lösung. v. Buddenbrock betrachtete nämlich als erster das Halterenproblem vergleichend biologisch, nicht bloß nach rein mechanischen Gesichtspunkten wie seine Vorgänger. Demnach kam er zu dem Schluß, daß die Schwirrflieger unter den Insekten wesentlich höhere nervöse Energien für den Flug benötigen müßten als die Flatterflieger. Die Halteren seien deshalb spezielle Reizorgane zur Erzeugung dieser benötigten Energie: Stimulationsorgane, so wie die von v. Uexküll[3] 1901 untersuchten Sinneskölbchen der Medusen. Bereits 1919 konnte v. Buddenbrock in einer größeren Arbeit auf Grund vieler Versuchsergebnisse «mit einiger Genugtuung» feststellen, daß sich seine «theoretisch entwickelten Gedanken im Kernpunkte als richtig herausgestellt haben[4]». Demnach stand fest, daß die Halterenfrage in erster Linie ein zentralnervöses Problem sei. Die Gleichgewichts- und Steuertheorie war weitgehend unwahrscheinlich gemacht. Die Hauptergebnisse der Arbeit waren: 1. Die Halteren der Fliegen sind Organe zur Erzeugung potentieller Nervenenergie, die den Flügeln zufließt und ihnen ihre frequente und weit ausholende Bewegung ermöglicht. Sie sind den Sinneskölbchen der Medusen vergleichbar. 2. Bei manchen Dipteren wirken die Halteren nicht nur auf die Flügel, sondern auch auf die Muskulatur der Beine. 3. Halteren und Flügel bewegen sich beim normalen Tier synchron. Der Synchronismus läßt sich jedoch experimentell aufheben. Trotzdem können die Tiere noch fliegen. Die Wirkung der Halteren auf die Flügel kann daher nicht reflektorischer Natur sein.

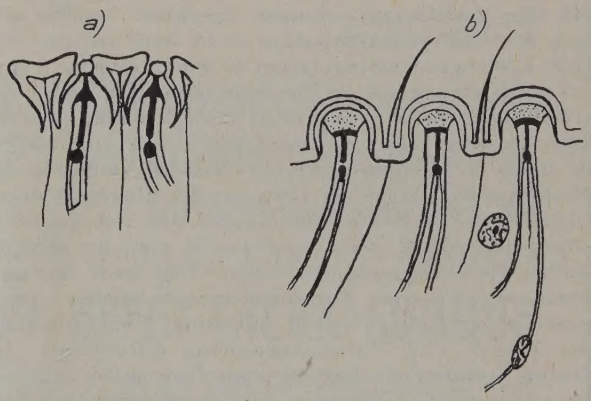



Abb. 3. *a*) Dorsale Sinnespapillen von *Calliphora* im Querschnitt. *b*) Ventrale Sinneskuppeln von *Eristalis* im Querschnitt. (nach Pflugstaedt, 1912).

[1] Das gesamte alte Schrifttum von 1711 bis 1940 ist bei Melin[2] (1941) angegeben.

[2] D. Melin, Uppsala Univ. Arsskrift (1941) 247 Seiten.

[3] H. Pflugstaedt, Z. wiss. Zool. *100*, 1 (1912).

[1] E. Weinland, Z. wiss. Zool. *51*, 55 (1891).

[2] W. v. Buddenbrock, Verh. Heidelberger nat. med. Vereinig. N. F. 13 (1917), S. 497.

[3] J. v. Uexküll, Mitt. Zool. Stat. Neapel *14* (1901).

[4] W. v. Buddenbrock, Pflüg. Arch. *175*, 125 (1919).

In der Folge wurde die Ansicht v. Buddenbrocks zunächst ziemlich allgemein anerkannt. Sein Schüler Brauns[1] untersuchte 1938 in einer eingehenden Arbeit vor allem den Zusammenhang zwischen Halterenausbildung und Flugfähigkeit bei den verschiedensten Arten. Er stellte diesbezüglich eindeutige Beziehungen fest. Insbesondere konnte er zeigen, daß die Zahl der Sinneskuppeln auf den Halteren und die Ausbildung der Vorderflügel in enger Beziehung zueinander stehen. Er schloß sich ganz der Stimulationstheorie v. Buddenbrocks an.

Gegen die Auffassung der Halteren als reine Stimulationsorgane haben sich Fraenkel[2], 1932, Fraenkel und Pringle[3], 1938, und Melin[4], 1941, ausgesprochen. Fraenkel und Pringle haben die alte Gleichgewichtstheorie wieder aufgegriffen und zu beweisen versucht, daß die Halteren als Gyroskope funktionieren. Wigglesworth[5] hat im Anschluß daran 1946 auf das Verhalten

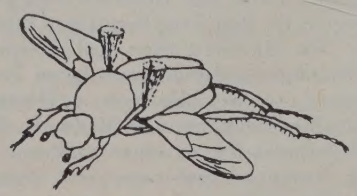


Abb. 4. *Sisyphus* beim Abflug (aus v. Buddenbrock, 1937, nach v. Lengerken, 1934).

des Lamellikorniers *Sisyphus Schäfferi* hingewiesen. Wie Lengerken[6] bereits 1934 beschrieben hat, schwirrt dieses Tier vor dem Abflug mit seinen nach oben gehaltenen Mittelbeinen ähnlich wie die Fliegen mit ihren Halteren (Abb. 4). Selbst wenn sich endgültig erweisen sollte, daß die Halteren Gleichgewichtsorgane sind – wozu noch eingehende experimentelle Untersuchungen notwendig wären –, so blieben damit jedenfalls die Ausfallserscheinungen unerklärt, welche sich nach der Halterenexstirpation nicht bloß auf die fehlende Gleichgewichtsregulation beziehen lassen.

Ernster zu nehmen ist die eingehende und vielseitige Arbeit Melins, 1941. Er kommt zu dem Schluß, daß die Halteren nicht rein tonuserzeugend – also stimulierend im Sinne v. Buddenbrocks – wirken, sondern auf reflektorischem Wege die Tätigkeit der Flugmuskulatur beeinflussen. In diesem Sinne spricht er von speziellen «myodynamischen Reflexen», welche von den schwingenden Halteren ausgehen sollen. Und zwar ist nach seiner Ansicht zum Zustandekommen solcher «myodynamischer Reflexe» nicht unbedingt Synchronismus von Flügel- und Halterenbewegung erforderlich. Im Grunde genommen besteht zwischen seiner und v. Buddenbrocks Auffassung nur ein Unterschied hinsichtlich des Mechanismus der Halterenwirkung auf das Nervensystem. Die Grundauffassung v. Buddenbrocks, daß die Halteren über die Thorakalganglien auf die Flug- und Beinmuskulatur wirken, wird von Melin in vollem Maße bestätigt. Die Frage, ob Stimulation oder «myodynamischer Reflex», ist an sich rein theoretischer Natur und lediglich abhängig von der Fassung der Begriffe.

Jedenfalls ist es höchst bemerkenswert, daß wir auch heute noch – über 200 Jahre nach dem ersten Erklärungsversuch – von der Halteren«*frage*» sprechen. Das eine ist allerdings inzwischen klargeworden: Die Halterenfrage ist in erster Linie ein Problem der Nervenphysiologie. Der erste Forscher, welcher diese Erkenntnis klar ausgesprochen hat, war v. Buddenbrock. Seine Überlegungen, Versuche und Schlußfolgerungen können im wesentlichen auch heute noch als die «vermutliche Lösung der Halterenfrage» gelten. Mit der ihm eigenen Bescheidenheit und Sachlichkeit hat v. Buddenbrock selber seine Auffassung nur als Vermutung ausgesprochen.

[1] A. Brauns, Zool. Jb., allg. Zool. *59*, 246 (1939).
[2] G. Fraenkel, Z. vgl. Physiol. *16*, 371 (1932).
[3] G. Fraenkel und J. W. S. Pringle, Nature *141*, 919 (1938).
[4] D. Melin, Upsala Univ. Arsskrift (1941) 255, 247 Seiten.
[5] V. B. Wigglesworth, Nature *157*, (1946).
[6] H. v. Lengerken, Biol. Zbl. *54*, 646 (1934).

*Summary*

Since the first description of the halteres in Diptera by Derham (1711) six different theories have been formed about the function of these organs:—(1) equilibration, (2) steering, (3) sound production, (4) hearing, (5) smelling, (6) respiration.

In 1916 and 1919, following v. Uexküll, v. Buddenbrock showed by careful considerations and experiments that the haltere problem is above all a problem of nerve physiology. Consequently the halteres are organs stimulating the production of potential nervous energy for wings and legs. This theory is the best explanation of the well-known experimental finding: after extirpation or fixation of the halteres many Diptera are unable to fly at all, or at least to fly well, and part of them are unable to run well.

Fraenkel and Pringle (1938) and Melin (1941) rejected the stimulation theory. Fraenkel and Pringle think the halteres are gyroscopes, that is, organs of equilibrium, but without experimentally proving their theory. Melin agrees with v. Buddenbrock that the haltere problem is a problem of nervous physiology, but he denies the stimulative effect of the halteres.

SUISSE — ITALIE

## Congrès international de physique

Congrès international de physique nucléaire et des rayons cosmiques, Bâle-Como

du 5 au 16 septembre 1949

Sous le patronage des Sociétés suisses et italiennes de physique, un Congrès international de physique nucléaire et des rayons cosmiques aura lieu cette année au mois de septembre. Ce congrès bénéficie de l'appui de l'Union internationale de physique pure et appliquée.

La première partie du congrès aura lieu à Bâle

du 5 au 9 septembre 1949.

La discussion portera sur les méthodes de la physique nucléaire et sur les résultats et méthodes de la physique théorique basée sur la physique nucléaire et l'électrodynamique.

La deuxième partie aura lieu à Como

du 11 au 16 septembre 1949.

Elle sera consacrée aux rayons cosmiques. En outre, une manifestation est prévue pour honorer la mémoire de Volta.

Pour le comité d'organisation:
Prof. P. Huber, Bâle
Prof. G. Polvani, Milan

Secrétariat du congrès: Bâle, 82, Klingelbergstraße.

# Comment prescrire le Diparcol

## ANTIPARKINSONIEN
*de synthèse*

# DIPARCOL

( 2987 R.P )

**Dosage faible**

Dragées dosées à 0g05 (TUBES DE 50)

**Dosage fort**

Dragées dosées à 0g25 (TUBES DE 20)

**DOSE JOURNALIÈRE DE DÉBUT:**
0g10 à 0g50 suivant l'intensité des symptômes

**AUGMENTER** ensuite la posologie **TOUS LES 5 à 7 JOURS** par paliers de 0g10 à 0g15 ( formes légères ) ou de 0g25 à 0g40 ( formes graves )

**JUSQU'A EFFET THÉRAPEUTIQUE**

*Au cours de la progression, remplacer les dragées à 0g05 par les dragées à 0g25*

DOSE MOYENNE JOURNALIÈRE: 0g75 à 1g25

**DOSE MAXIMUM JOURNALIÈRE: "DEUX GRAMMES"**

Pour les cas d'urgence : Ampoules de 5cm³ dosées à 0g25 (BOÎTES DE 5)

*1/2 à 1 ampoule par voie intramusculaire ou intraveineuse lente*

SOCIÉTÉ PARISIENNE D'EXPANSION CHIMIQUE
RHÔNE Specia POULENC
PARIS
21, RUE JEAN GOUJON-8e-TÉL. BALZAC: 22-94

ODETTE ZÉAU

## ELEMENTE DER MATHEMATIK

*Revue de mathématiques élémentaires*
*Rivista di matematica elementare*
*Zeitschrift zur Pflege der Mathematik und zur Förderung des mathematisch-physikalischen Unterrichts*

*Organ für den Verein Schweizerischer Mathematiklehrer*

Die Zeitschrift hat in ihrem Arbeitsbereich Abhandlungen aus allen Gebieten der reinen und angewandten Mathematik, der mathematischen Physik und der Geschichte der Mathematik aufgenommen, die für ein breiteres Publikum von allgemeinem Interesse sind. Sie versucht, durch Forschungsberichte und Literaturübersichten die Verbindung zwischen der Schulmathematik und der wissenschaftlichen Forschung aufrechtzuerhalten. Die zahlreichen Aufgaben, für die eine besondere Rubrik reserviert wurde, sollen dem Lehrer mannigfache Hinweise für den Unterricht geben.

*Abonnementspreis für jährlich 6 Hefte im Umfang von je 16–24 Seiten Fr. 6.– (Ausland Fr. 9.–)*
*Einzelnummer Fr. 1.50*

*Abonnementsbestellungen durch jede Buchhandlung*

VERLAG BIRKHÄUSER AG.
BASEL (SCHWEIZ)



Im Rahmen der *Beihefte zur Zeitschrift «Elemente der Mathematik»* erscheint eine Reihe kurzer

## Biographien über Schweizer Mathematiker

Neben den wichtigsten Daten, einer Charakteristik der Persönlichkeit und der Würdigung des Werkes an Beispielen enthält jedes Heft mehrere Illustrationen.

Bereits sind erschienen:

JAKOB STEINER – Beiheft Nr. 2, par Dr. L. Kollros, professeur à l'E.P.F. (en langue française). Avec deux portraits et un fac-similé.

LUDWIG SCHLÄFLI – Beiheft Nr. 4, von Dr. J. J. Burckhardt, Professor an der Universität Zürich. Zwei Porträts, zwei Strichzeichnungen und ein Faksimile.

LEONHARD EULER – Beiheft Nr. 3, von Dr. R. Fueter, Professor an der Universität Zürich. Mit zwei Porträts und einem Faksimile.

JOST BÜRGI und die Logarithmen, von Dr. E. Voellmy, Basel. – Beiheft Nr. 5. Ein Porträt und zwei farbige Wiedergaben der ersten Logarithmentafeln aus dem Jahre 1620.

Jedes Heft hat einen Umfang von 24 Seiten und kostet Fr. 3.50.

*Zu beziehen durch jede Buchhandlung*
VERLAG BIRKHÄUSER - BASEL